

# Der Östrogenrezeptor GPER im Hoden und in peritubulären Zellen

Franziska Sandner



München 2015



Aus der Anatomischen Anstalt der LMU München

Vorstand: Prof. Dr. med. Jens Waschke

Lehrstuhl Anatomie III - Zellbiologie

Leitung: Prof. Dr. rer. nat. Michael Kiebler

# Der Östrogenrezeptor GPER im Hoden und in peritubulären Zellen

Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der  
Medizin an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

Franziska Sandner

aus München

2015

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Artur Mayerhofer

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Thomas Gudermann  
Prof. Dr. Oliver Reich

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 01.10.2015

## EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Doktorarbeit mit dem Thema

### **Der Östrogenrezeptor GPER im Hoden und in peritubulären Zellen**

selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach Ihrer Herkunft unter der Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

---

Ort, Datum

---

Franziska Sandner



## Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>I</b>
<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>IV</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>V</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>VI</b>
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1. <b>Morphologie und Funktion des Hodens .....</b>	<b>1</b>
1.2. <b>Männliche Sexualhormone.....</b>	<b>2</b>
1.3. <b>Spermatogenese und Spermiogenese.....</b>	<b>3</b>
1.3.1. Spermatogenese.....	3
1.3.2. Spermiogenese .....	4
1.4. <b>Das peritubuläre Hodenkompartiment.....</b>	<b>5</b>
1.5. <b>Morphologische Hodenveränderungen bei nicht-obstruktiver Azoospermie</b>	<b>6</b>
1.5.1. „Mixed Atrophy“-Syndrom (MA) .....	7
1.5.2. „Sertoli Cell Only“-Syndrom (SCO).....	7
1.5.3. „Germ Cell Arrest“-Syndrom (GA) .....	8
1.6. <b>Östrogene im Hoden .....</b>	<b>9</b>
1.7. <b>Der Östrogenrezeptor 1 und 2 (ESR 1/ESR 2) .....</b>	<b>10</b>
1.7.1. Entdeckung und Aktivierung von ESR 1 und ESR 2 .....	10
1.7.2. ESR 1 und ESR 2-Vorkommen im männlichen Reproduktionstrakt .....	10
1.8. <b>G Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) .....</b>	<b>11</b>
1.9. <b>Der G Protein-gekoppelte Östrogenrezeptor (GPER).....</b>	<b>12</b>
1.9.1. Die Entdeckung von GPER .....	12
1.9.2. Zelluläre Lokalisation und Funktion von GPER .....	13
1.9.3. GPER-Vorkommen im männlichen Reproduktionstrakt .....	13
1.9.4. Liganden am GPER.....	14
1.10. <b>Studienziele .....</b>	<b>15</b>
<b>2. Verwendete Materialien.....</b>	<b>16</b>
2.1. <b>Humanes Hodengewebe .....</b>	<b>16</b>
2.2. <b>Hodengewebe vom Rhesusaffen .....</b>	<b>16</b>
2.3. <b>Hodengewebe von Maus und Ratte.....</b>	<b>17</b>
<b>3. Methoden .....</b>	<b>18</b>
3.1. <b>Immunhistochemie .....</b>	<b>18</b>
3.2. <b>DAPI-Färbungen .....</b>	<b>19</b>
3.3. <b>Immunfluoreszenz-Doppelfärbung .....</b>	<b>19</b>
3.4. <b>Zellkultur.....</b>	<b>20</b>
3.4.1. Kultivierung von HTPCs.....	20
3.4.2. Zellstimulation .....	21

<b>3.5. Proteinbiochemische Methoden.....</b>	<b>21</b>
3.5.1. Proteinextraktion und Konzentrationsbestimmung.....	21
3.5.2. Western Blot.....	22
<b>3.6. Zellviabilität .....</b>	<b>23</b>
3.6.1. CASY – „Cell Counter and Analyzer“ System .....	23
3.6.2. Intrazelluläre $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration.....	24
3.6.3. „Live Cell Imaging“ .....	25
<b>3.7. Statistik .....</b>	<b>26</b>
<b>4. Ergebnisse .....</b>	<b>27</b>
4.1. GPER-Expression im Hoden von Primaten und Nagern.....	27
4.2. Lokalisation von GPER im Hoden .....	29
4.3. Altersabhängige GPER-Expression beim Affen .....	31
4.4. GPER-Expression bei infertilen Männern.....	33
4.5. GPER in HTPCs: Funktionelle Untersuchungen mit G 1 und G 15 .....	34
4.5.1. $\text{Ca}^{2+}$ -Messungen .....	35
4.5.2. DAPI-Kernfärbungen.....	36
4.5.3. Versuche mit CASY .....	37
4.5.4. „Live Cell“- Beobachtungen.....	38
<b>5. Diskussion .....</b>	<b>40</b>
5.1. GPER-Lokalisation im Primatenhoden.....	40
5.2. Intrazelluläre Lokalisation von GPER.....	42
5.3. Aktivierung von GPER in HTPCs.....	43
5.4. GPER-vermittelte antiproliferative Wirkung auf HTPCs .....	44
5.5. Zusammenhang zwischen der GPER-Expression im Hoden und Fertilität....	45
<b>6. Zusammenfassung .....</b>	<b>46</b>
<b>7. Anhang .....</b>	<b>48</b>
7.1. Geräte .....	48
7.2. Verbrauchsmaterialien .....	49
7.3. Antikörper .....	49
7.5. Zweitantikörper.....	50
7.6. Stimulantien.....	50
7.7. Kits .....	50
7.9. Reagenzien .....	51
7.11. Puffer und Lösungen.....	52
7.12. Medien.....	53
7.13. Programme und Software.....	54
<b>8. Literatur und Quellenverzeichnis .....</b>	<b>55</b>
<b>9. Danksagung.....</b>	<b>60</b>



<b>10. Publikation, Poster und Fördermittel .....</b>	<b>61</b>
---	-----------

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. 1</b>	Schematischer Ausschnitt eines Tubulus seminiferus mit Umgebung.
<b>Abb. 2</b>	Lichtmikroskopische Aufnahme eines Tubulus seminiferus mit Darstellung der peritubulären Zellen.
<b>Abb. 3</b>	Hämatoxylin-Färbung des Hodens bei „Mixed Atrophy“-Syndrom.
<b>Abb. 4</b>	Hämatoxylin-Färbung des Hodens bei „Sertoli Cell Only“-Syndrom.
<b>Abb. 5</b>	Hämatoxylin-Färbung des Hodens bei „Germ Cell Arrest“-Syndrom.
<b>Abb. 6</b>	Umwandlung von Testosteron in $17\beta$ -Östradiol (E <sub>2</sub> ) durch Aromatase.
<b>Abb. 7</b>	Struktur von G Protein-gekoppelten Rezeptoren.
<b>Abb. 8</b>	Aktivierung G Protein-gekoppelter Rezeptoren.
<b>Abb. 9 A-F</b>	Immunhistochemische Färbung von Hodenschnitten des Menschen (A, B), des Rhesusaffen (C, D), der Maus (E, F) und der Ratte (G, H) mit $\alpha$ -GPER.
<b>Abb. 10 A-B</b>	Immunhistochemische Färbung von Hodenschnitten des Affen mit $\alpha$ -GPER.
<b>Abb. 11 A-B</b>	Fluoreszenzdoppelfärbung humaner Hodenschnitte mit $\alpha$ -GPER und $\alpha$ -Mastzelltryptase.
<b>Abb. 12</b>	Überlagerung und Fusion der Abb. 11 A und 11 B.
<b>Abb. 13 A-B</b>	Bestätigung der Expression von GPER in kultivierten HTPCs dreier Individuen (1-3) durch PCR (A) und Western Blot (B).
<b>Abb. 14 A-E</b>	GPER-Expression während der Entwicklung des Rhesusaffen.
<b>Abb. 15 A-B</b>	GPER-Expression bei Patienten mit SCO und GA.
<b>Abb. 16 A-B</b>	GPER-Expression bei Patienten mit MA.
<b>Abb. 17</b>	$\text{Ca}^{2+}$ -Messungen an HTPCs nach G 1-Stimulation.
<b>Abb. 18</b>	$\text{Ca}^{2+}$ -Messungen an HTPCs nach E <sub>2</sub> -Stimulation.
<b>Abb. 19</b>	DAPI-Fluoreszenzfärbung der Zellkerne von HTPCs.
<b>Abb. 20</b>	Zellzahlbestimmung mit CASY.
<b>Abb. 21 A-D</b>	„Time-Lapse“-Bilderfolge von HTPCs nach Stimulation mit G 1 und G 15.

## Tabellenverzeichnis

<b>Tab. 1</b>	Tabelle über verwendete Gewebeproben von Rhesusaffen.
<b>Tab. 2</b>	Zusammensetzung der Acrylamidgele zur Gelelektrophorese.
<b>Tab. 3</b>	Auflistung der verwendeten Geräte.
<b>Tab. 4</b>	Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien.
<b>Tab. 5</b>	Auflistung der verwendeten Antikörper.
<b>Tab. 6</b>	Auflistung der verwendeten Zweitantikörper.
<b>Tab. 7</b>	Auflistung der verwendeten Stimulantien und ihrer Lösungsmittel.
<b>Tab. 8</b>	Auflistung der verwendeten Kits.
<b>Tab. 9</b>	Auflistung der verwendeten Reagenzien.
<b>Tab. 10</b>	Rezepturen zur Herstellung der verwendeten Puffer und Lösungen.
<b>Tab. 11</b>	Rezepturen zur Herstellung der verwendeten Medien.
<b>Tab. 12</b>	Auflistung der verwendeten Programme und Software.

**Abkürzungsverzeichnis**

Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
Bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Celsius
ca.	circa
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CASY	„Cell Counter and Analyzer“ System
cm	Zentimeter
cm <sup>2</sup>	Quadratzentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
COX 2	Cyclooxygenase 2
Cy 3	Cyanin 3
d	Tag(e)
DAB	Diaminobezidin
DAPI	4', 6'-diamidino-2'-phenylindon
DMEM	„Dulbecco's Modified Eagle's Medium“
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
E <sub>2</sub>	Östradiol
ECM	Extrazelluläre Matrix
EGF	„Epidermal Growth Factor“
ELISA	„Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay“
ER	Östrogenrezeptor
ERK 1/2	extrazellulär regulierte Kinase 1/2
ESR 1/2	Östrogenrezeptor 1/2
FCS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluoreszierendes Isothiocyanat

Fluo-4-AM	Fluo-4, Acetoxy-Methylester
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
g	Gramm
GA	„Germ Cell Arrest“-Syndrom (Keimzellarrest)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GDNF	„Glia cell line Derived Neurotrophic Factor“
GDP	Guanosin-Diphosphat
GnRH	„Gonadotropin Releasing Hormone“
GPOR	G Protein-gekoppelter Östrogenrezeptor
GPCR	G Protein-gekoppelter Rezeptor
GTP	Guanosin-Triphosphat
h	Stunde(n)
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazineethanesulfonamidessig
HTPC	„Human Testicular Peritubular Cell“
IgG	Immunglobulin G
IHC	Immunhistochemie
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
LH	Luteinisierendes Hormon
M	Molar
MA	„Mixed Atrophy“-Syndrom
mg	Milligramm
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimolar
n	Anzahl
ng	Nanogram
nm	Nanometer
ONPRC	Oregon National Primate Research Centre
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung

PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
s.	siehe
SCO	„Sertoli Cell Only“-Syndrom
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Tab.	Tabelle
TEMED	Tetramethyl-Ethylen-Diamin
V	Volt
WB	Western Blot
y	Jahr(e)
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
μM	Mikromolar
z. B.	zum Beispiel







## 1. Einleitung

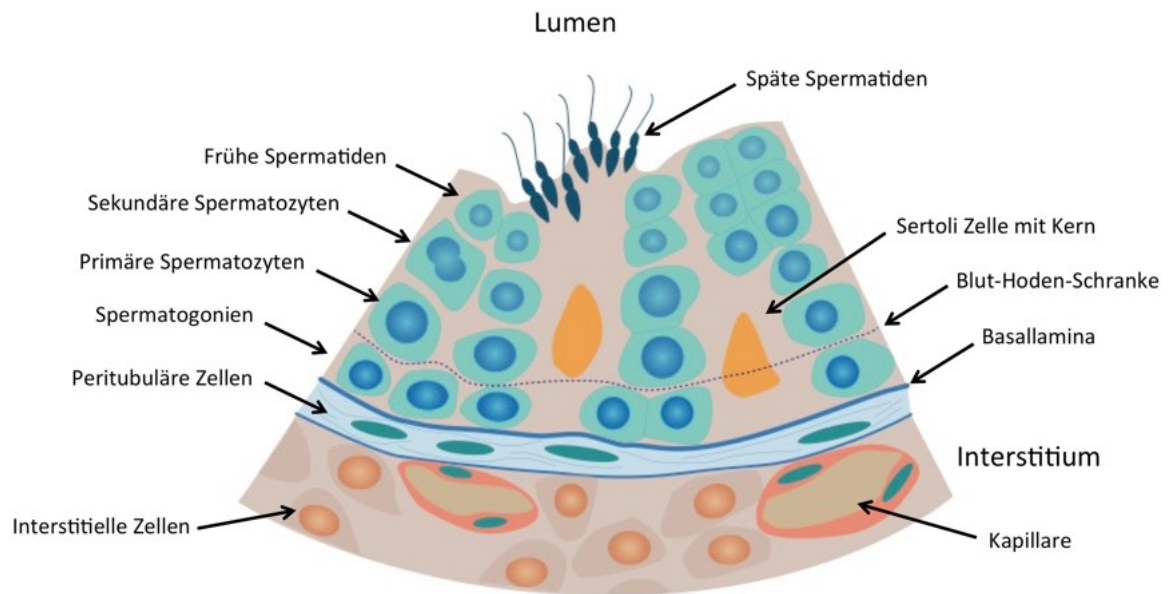
### 1.1. Morphologie und Funktion des Hodens

Der Hoden ist das zentrale Organ der männlichen Fortpflanzung. Seine Hauptaufgabe besteht in der Produktion von Steroiden und Spermien. Der menschliche Hoden ist paarig angelegt, ungefähr 2 x 4 cm groß und wiegt jeweils etwa 20 g (1). Bindegewebige Septen unterteilen den Hoden in ca. 350 Läppchen (Lobuli). Die Lobuli enthalten zahlreiche kleine Kanälchen, Tubuli seminiferi contorti, mit einem Durchmesser von ca. 150-250 µm. In den Tubuli seminiferi contorti findet die Spermatogenese statt. Sie sind stark geknäuelte und machen ca. 90 % des gesamten Hodenvolumens aus. Pro Hoden entspricht das etwa 1000 Kanälchen (1,2). Ein einzelner Tubulus ist 30-70 cm lang und geht an beiden Enden in ein netzartiges Gangsystem (Rete testis) über. Die Ductuli efferentes verbinden das Rete testis mit dem Nebenhodengang (Ductus epididymidis).

Die Tubuli seminiferi werden von einer äußeren Basallamina begrenzt, der eine Reihe von Spermatogonien und Sertoli-Zellen direkt anliegen. Weiter lumenwärts liegen die reifenden Keimzellen. Die Sertoli-Zellen steuern die Spermatogenese und bilden zudem durch „tight junctions“ eine immunologisch wichtige Barriere: Die Blut-Hoden-Schranke (1,3–5). Sie sind zuständig für die Stabilisierung, Ernährung und Bewegung der Keimzellen während des Reifungsprozesses. Außerdem phagozytieren sie überflüssig gewordene Keimzellanteile (1).

Um die Basallamina der Tubuli finden sich beim Mann 5-7 Schichten glattmuskelähnlicher peritubulärer Zellen („Human Testicular Peritubular Cells“ - HTPCs). Die peritubulären Zellen haben die Fähigkeit sich zu kontrahieren und sind wichtig für den Transport der noch unbeweglichen Spermien. Zudem sezernieren die peritubulären Zellen Produkte, die vermutlich wichtig für die Steuerung der Spermatogenese sind (6–9). Ihr Beitrag zum reibungslosen Ablauf der Spermatogenese steht im Fokus aktueller Studien der Reproduktionsmedizin.

Zwischen den Tubuli seminiferi befindet sich das Interstitium mit lockerem Bindegewebe, Blutgefäßen, Lymphgefäßen, Nervenfasern sowie den Testosteron-produzierenden Leydig-Zwischenzellen und vereinzelt Zellen der Immunabwehr (1,2,4,5).



**Abb. 1: Schematischer Ausschnitt eines Tubulus seminiferus mit Umgebung.** Erstellt mit Adobe Illustrator (s. Tab. 12) nach (1).

Der tubulären Basallamina liegen lumenwärts die Spermatogonien und Sertoli-Zellen direkt an. Aus den Spermatogonien entstehen die späteren Spermatiden. Um die Tubuli herum ist eine Schicht peritubulärer Zellen angeordnet, die hier - wie bei den meisten kleinen Säugetieren - einlagig ist. Zwischen den Tubuli befindet sich das Interstitium, es enthält unter anderem Leydig-Zwischenzellen, kleine Blutgefäße und einige Immunzellen.

## 1.2. Männliche Sexualhormone

Die männliche Fertilität ist abhängig von einem äußerst sensiblen, hormonellen Gleichgewicht. Dabei spielt das männliche Sexualhormon Testosteron eine Schlüsselrolle. Testosteron ist für die Ausreifung der männlichen Geschlechtsorgane und für die Funktion des Hodens unabdingbar. Mit Beginn der Pubertät induziert Testosteron die Spermatogenese und hält sie beim Erwachsenen aufrecht. Zudem reguliert Testosteron die Sekretionsrate der Geschlechtsdrüsen (1).

Auch außerhalb des Hodens hat Testosteron großen Einfluss auf den menschlichen Körper. Es bestimmt den männlichen Phänotyp unter anderem durch die Regulation der Körperbehaarung, des Körperlängenwachstums und der Talgsekretion (1).

95 % des Testosterons (ca. 3-10 mg/dl) werden in den Leydig-Zwischenzellen des Hodens produziert. Die restlichen 5 % stammen aus der Nebennierenrinde (1). Die Sekretion von Testosteron unterliegt tageszyklischen Schwankungen und wird von Hormonen aus dem

Hypothalamus und der Hypophyse über die hypothalamisch-hypophysär-gonadotrope Achse gesteuert. Pulsatil freigesetztes GnRH („Gonadotropin Releasing Hormone“) aus dem Hypothalamus führt zur Freisetzung der Gonadotropine FSH (Follikel stimulierendes Hormon) und LH (luteinisierendes Hormon) aus dem Hypophysenvorderlappen (5,10).

Die Leydig-Zwischenzellen besitzen LH-Rezeptoren auf der Zelloberfläche und werden über die Bindung von LH zur Produktion von Testosteron angeregt. Zusätzlich kommunizieren die Sertoli-Zellen auf parakrinem Weg mit den Leydig-Zwischenzellen und beeinflussen ebenfalls die Testosteronproduktion. FSH bindet ausschließlich an Sertoli-Zellen und stimuliert dort das Enzym Aromatase, das Testosteron zu Östradiol umwandelt (s. Abb. 6) und die 5 $\alpha$ -Reduktase, die Testosteron in Dihydrotestosteron umwandelt (1,11). Östradiol und Dihydrotestosteron werden für die Keimzellreifung benötigt (1). Über eine negative Rückkopplung hemmen hohe Testosteronkonzentrationen im Blut wiederum die weitere Freisetzung von GnRH aus der Hypophyse (5,10).

### 1.3. **Spermatogenese und Spermiogenese**

Die Entwicklung einer unreifen Keimzelle beginnt bei der spermatogonialen Stammzelle und führt hin zum ausgereiften Spermatozoon. Sie lässt sich in verschiedene Schritte untergliedern. Während der Spermatogenese kommt es zunächst zur Proliferation von Spermatogonien. Es folgen die Meiose und die weitere Zelldifferenzierung der postmeiotischen Spermatischen, die man auch Spermiogenese nennt. Der Vorgang bis zum reifen Spermium dauert in etwa 60-70 Tage und ist auf eine konstante Umgebungstemperatur (35° C) angewiesen (1).

#### 1.3.1. **Spermatogenese**

Bis heute sind die genauen Abläufe der Spermatogenese des Mannes nicht vollständig geklärt (12). Basal im Keimepithel des Tubulus seminiferus befinden sich Spermatogonien, die in Typ A und Typ B unterteilt werden. Die Spermatogonien vom Typ A werden wiederum in die Gruppen „A pale“ und „A dark“ eingeteilt. Man geht davon aus, dass die „A dark“-Zellen unter normalen Bedingungen nicht direkt an der Produktion der Spermatozyten beteiligt sind. Die „A pale“ Zellen weisen im Gegensatz zu den „A dark“-Zellen eine hohe Proliferationsrate auf und entsprechen den spermatogonialen Stammzellen. Die „A dark“-Zellen kann man gewissermaßen als Reservestammzellen bezeichnen (13).

Ein Teil der „A pale“-Spermatogonien differenziert sich weiter zu Spermatogonien Typ B. Die übrigen „A pale“-Spermatogonien stehen als Ausgangszellen für die Spermatogenese weiterhin zur Verfügung. Aus den Spermatogonien vom Typ B entstehen präleptotäne Spermatozyten die unmittelbar vor dem Beginn der meiotischen Reifeteilungen stehen und mit der DNS-Synthese beginnen. Sobald die Spermatozyten tetraploid sind (DNA-Gehalt von  $4n$ ) durchlaufen sie die verschiedenen Phasen der meiotischen Reifeteilung.

Bei der ersten meiotischen Zellteilung finden homologe Rekombinationen statt. Es entstehen zwei sekundäre Spermatozyten (Spermatozyten II) mit je einem haploiden Chromosomensatz ( $2n$ ). Dann erfolgt die zweite meiotische Teilung. Dabei kommt es zur Halbierung des DNA-Gehalts auf nunmehr  $1n$ . Die entstandene Zelle wird Spermatide genannt und nähert sich mit fortschreitender Reifung dem Tubuluslumen an.

Aus einem primären Spermatozyt ( $4n$ ) sind folglich durch zwei meiotische Teilungen vier Spermatiden (mit je  $1n$ ) entstanden (vgl. Abb. 1). Die Spermatiden sind zunächst noch durch Zytoplasmabrücken verbunden, die sich erst im weiteren Verlauf der Reifung lösen (1,5,12).

### 1.3.2. Spermiogenese

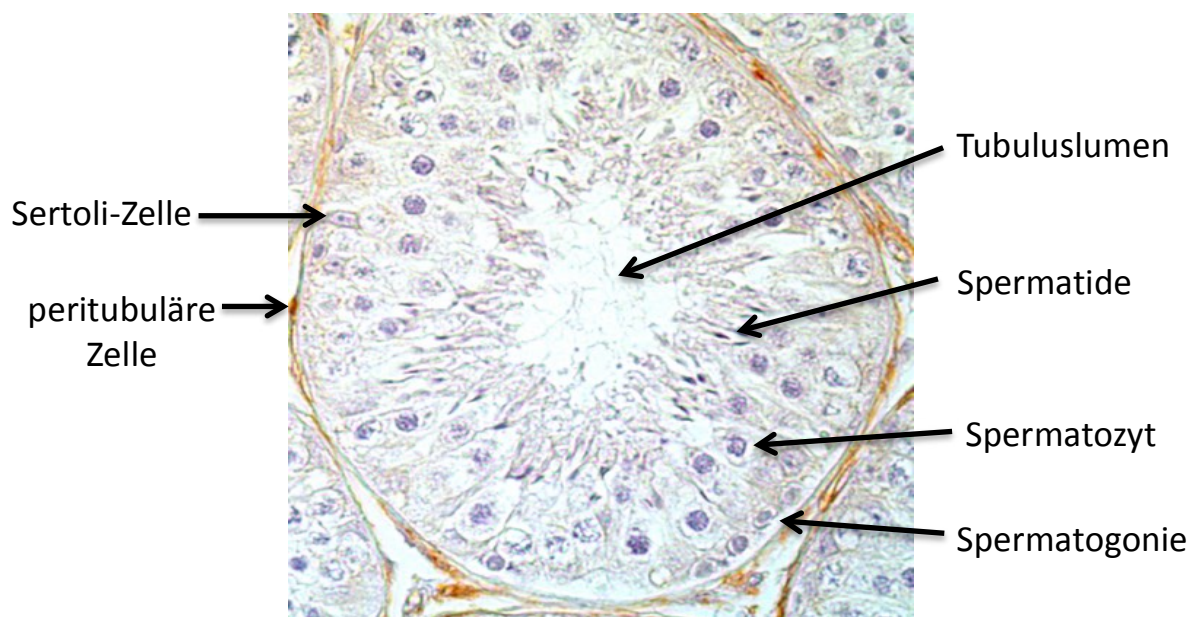
Unter Spermiogenese versteht man die Ausdifferenzierung der zunächst runden Spermatiden zu Spermatozoen (4,5,14). Dabei wird der Zellkern kondensiert und es bilden sich die verschiedenen Anteile aus: Der Kopf (caput) mit dem Akrosom und der Schwanz (cauda).

Der Kopf enthält die kondensierte Kernsubstanz. Das Akrosom sitzt dem Kopfteil kappenförmig auf und enthält hydrolytische Enzyme, die ihm das Durchdringen der äußeren Schicht der Eizelle (Zona pellucida) ermöglichen. Der Schwanz lässt sich in weitere fünf Untereinheiten gliedern, wobei die Geißel (Flagellum) der Spermienmotilität dient.

Die Freisetzung der Spermien in das Tubuluslumen bezeichnet man als Spermiation. Das saure Milieu im Tubuluslumen verhindert eine frühzeitige Bewegung der Spermien und spart Energie (1,4,5).

#### 1.4. Das peritubuläre Hodenkompartiment

Die Tubuli seminiferi des humanen Hodens sind von einem mehrschichtigen Ringsystem glattmuskelähnlicher peritubulärer Zellen umgeben (9). Das Ringsystem besteht aus spindelförmigen, sehr flachen Zellen, die von extrazellulärer Matrix (ECM) umgeben sind (9,15,16). Je nach Spezies kommen unterschiedlich viele ringförmige Schichten peritubulärer Zellen vor. Bei Primaten sind es üblicherweise 5-7 Schichten. Nager (s. Abb. 1 und Abb. 2) hingegen besitzen nur einen einzigen Zellring (9,15,17–19).



**Abb. 2: Lichtmikroskopische Aufnahme einen Tubulus seminiferus mit Darstellung der peritubulären Zellen.** Tubulus seminiferus der Ratte mit einlagiger, peritubulärer Zellschicht. Die peritubulären Zellen wurden mit Hilfe einer Glattmuskelfärbung hervorgehoben.

Beim Primaten unterscheiden sich die inneren und äußeren peritubulären Zellschichten hinsichtlich ihres Phänotyps: Entsprechend einer immunhistochemischen Analyse exprimieren die inneren Schichten Desmin (Intermediärfilament der Glattmuskelzellen), wohingegen die äußeren Schichten vermehrt den Bindegewebsmarker Vimentin exprimieren (9,17). Die Funktion dieser peritubulären, glattmuskelähnlichen Zellen ist nicht vollständig geklärt, man geht aber davon aus, dass die Zellen durch ihre Kontraktilität eine peristaltische Welle erzeugen (9,20,21) und so die noch immotilen Spermatozyten in Richtung Rete testis und Nebenhoden transportieren (7,17,22,23).

Außerdem erfüllen die peritubulären Zellen eine sekretorische Funktion (8,9,23–27). Sie produzieren die Komponenten der extrazellulären Matrix (ECM) (9,23–25) und beeinflussen

durch die exprimierten Produkte benachbarte Zellen wie z.B. die Sertoli-Zellen. Da humane testikuläre peritubuläre Zellen (HTPCs) lediglich durch eine Basallamina von den spermatogonialen Stammzellen getrennt sind, wird vermutlich auch die spermatogoniale Stammzellnische durch die sezernierten Produkte beeinflusst (8,9,16,28). Spinnler et al. konnten bereits die Sekretion eines für die Erhaltung der spermatogonialen Stammzellen essentiellen Faktors, GDNF („Glia cell line Derived Neurotrophic Factor“), durch HTPCs nachweisen (16). Bei infertilen Männern sind die peritubulären Zellen meist fibrotisch umgebaut (6). Da fibrotische Zellveränderungen üblicherweise mit einem Funktionsverlust einhergehen, ist dieser „Phänotypswitch“ mutmaßlich auch mit dem Verlust der Kontraktions- und Sekretionsfähigkeit der HTPCs verbunden. Humane testikuläre peritubuläre Zellen könnten auf diese Weise auch an der Entstehung von Infertilität maßgeblich beteiligt sein (6,9).

### 1.5. Morphologische Hodenveränderungen bei nicht-obstruktiver Azoospermie

Infertilität betrifft weltweit etwa jedes 10. Paar im reproduktionsfähigen Alter (28). In etwa der Hälfte aller Fälle liegt die Ursache beim Mann und steht meist im Zusammenhang mit morphologischen Veränderungen im Hoden, die sich auf die Samenqualität oder -quantität auswirken (28). Abgesehen von den bisher bekannten genetischen Defekten bleibt die Ätiologie der männlichen Infertilität in der Praxis oftmals ungeklärt.

Unabhängig von der zugrundeliegenden Ursache der Infertilität liegt bei etwa 15-20 % der infertilen Männer eine Azoospermie vor, also das Fehlen reifer Spermien im Ejakulat.

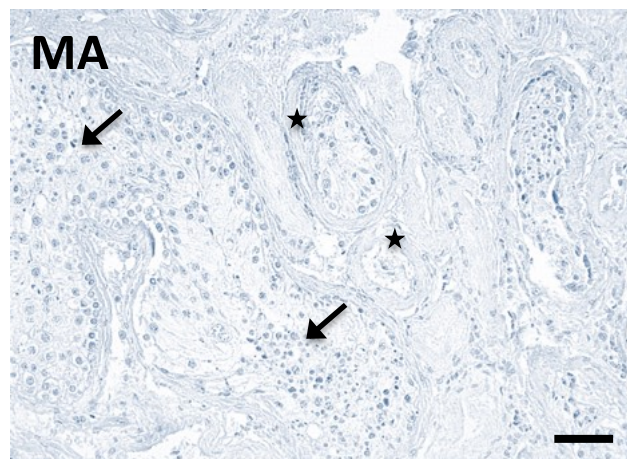
Man unterscheidet zwei grundsätzlich verschiedene Arten der Azoospermie: Die obstruktive und die nicht-obstruktive Azoospermie. Während bei der obstruktiven Azoospermie ein mechanisches Hindernis die Passage der Spermien verhindert, liegt das Problem bei der nicht-obstruktiven Azoospermie in der fehlenden oder fehlerhaften Produktion der Spermien und damit im Tubulus seminiferus (Samenkanälchen) des Hodens.

Die morphologische Bandbreite der nicht-obstruktiven Azoospermien reicht von vollständig atrophierten und hyalinisierten Samenkanälchen, die ausschließlich Sertoli-Zellen enthalten („Sertoli Cell Only“-Syndrom; SCO) über die gemischte Atrophie („Mixed Atrophy“-Syndrom; MA) mit teils normalen, teils atrophierten Tubuli, bis hin zum Keimzellarrest („Germ Cell Arrest“-Syndrom; GA), ein Reifungsarrest der in jeglicher Entwicklungsstufe während der Spermatogenese auftreten kann (12,29,30).

Bei den nicht-obstruktiven Azoospermien kann man meist strukturelle Veränderungen der Wände der Tubuli seminiferi beobachten. Üblicherweise sind die Tubuluswände fibrosiert und die extrazelluläre Matrix ist quantitativ und substanziell verändert (6). Zudem weist infertiles Hodengewebe auch entzündliche Veränderungen auf. Es kommt zur Anreicherung von interstitiellen Immunzellen wie beispielsweise den Mastzellen (31). Mastzellen bilden Tryptase, Cyclooxygenase 2 (COX 2) und Prostaglandine. Die Prostaglandine scheinen wiederum in Zusammenhang mit dem Verlust der Kontraktionsfähigkeit der HTPCs zu stehen (31–34).

#### 1.5.1. „Mixed Atrophy“-Syndrom (MA)

Die gemischte Atrophie (MA; s. Abb. 3) bezeichnet Veränderungen des Hodengewebes mit unterschiedlich starker Degeneration des Keimzellepithels benachbarter Areale. Dabei können in derselben Biopsie Hodenkanälchen mit normaler Spermatogenese (Pfeile, Abb. 3) genauso vorkommen wie Hodenkanälchen mit stärksten Veränderungen des Keimepithels (Sternchen, Abb. 3) bis hin zum vollständigen Verlust von Keimzellen (31,35). Die gemischte Atrophie findet sich vor allem bei Patienten mit idiopathischer Infertilität und geht mit einer verringerten Spermienzahl einher (36,37).



**Abb. 3: Hämatoxylin-Färbung des Hodens bei „Mixed Atrophy“-Syndrom (MA).**

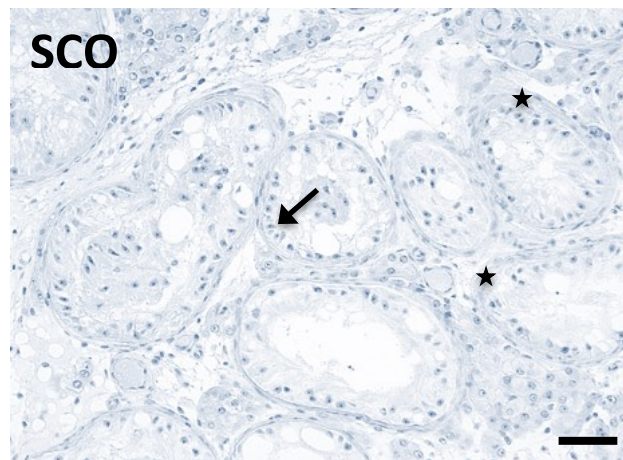
Man erkennt teils unauffällige Tubuli mit erhaltener Spermatogenese (Pfeile) und teils morphologisch stark veränderte Tubuli mit hyalinisierten Wänden (Sternchen). Skalierungsbalken ca. 50 µm.

#### 1.5.2. „Sertoli Cell Only“-Syndrom (SCO)

Das „Sertoli Cell Only“-Syndrom (SCO; s. Abb. 4) zeichnet sich durch vollständiges Fehlen der Keimzellen aus. Die Tubuli bestehen ausschließlich aus Sertoli-Zellen (Pfeil, Abb. 4) und die



Tubuluswände sind oftmals hyalinisiert (Sternchen, Abb. 4). Das Interstitium ist zellreicher und stärker ausgebildet als beim Gesunden (29,38).

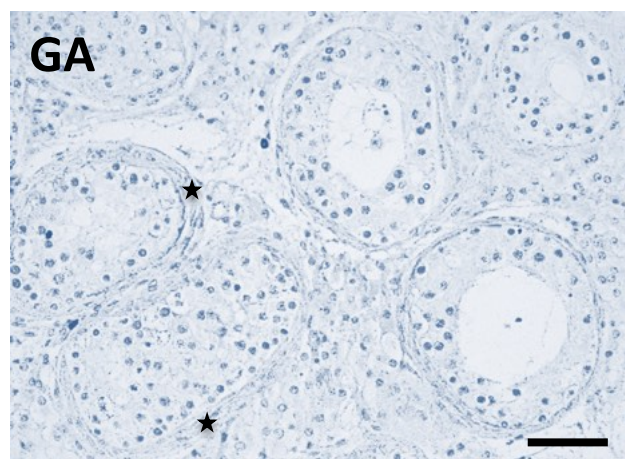


**Abb. 4: Hämatoxylin-Färbung des Hodens bei „Sertoli Cell Only“-Syndrom (SCO).**

Die Tubuli enthalten keine Keimzellen. Der Pfeil kennzeichnet Sertoli-Zellen, die Sternchen zeigen hyalinisierte Tubuluswände. Skalierungsbalken ca. 50 µm.

### 1.5.3. „Germ Cell Arrest“-Syndrom (GA)

Beim Keimzellarrest (GA; s. Abb. 5) wird die Spermatogenese nur unvollständig durchlaufen und es können sich keine Spermatiden mehr bilden. Bei GA zeigen sich oftmals verdickte Tubuluswände (Sternchen, s. Abb. 5). Die Tubuli seminiferi enthalten Sertoli-Zellen und auch einige Keimzellen, jedoch keine Spermatiden (s. Abb. 5) (29,38).



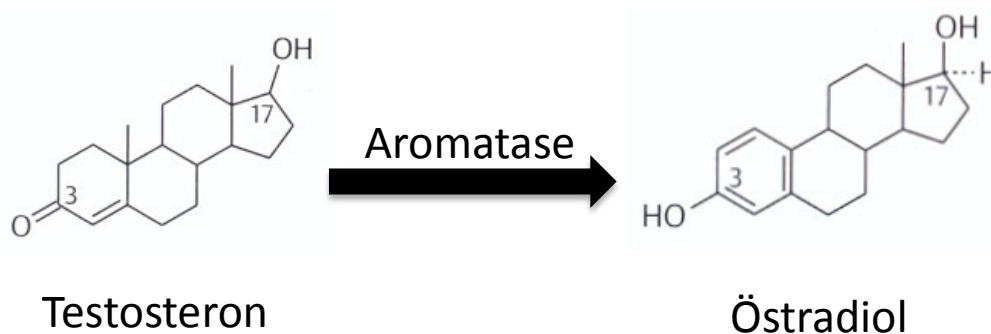
**Abb. 5: Hämatoxylin-Färbung des Hodens bei „Germ Cell Arrest“-Syndrom (GA).**

Die Tubuli enthalten keine Spermatiden. Die Sternchen kennzeichnen hyalinisierte Tubuluswände. Skalierungsbalken ca. 50 µm.



### 1.6. Östrogene im Hoden

Obwohl Östrogene lange Zeit als rein weibliches Hormon angesehen wurden, ist inzwischen unumstritten, dass Östrogene auch beim Mann essentiellen Einfluss auf die Fertilität haben. Dabei ist das Verhältnis von Östrogenen zu Testosteron entscheidend und eine genaue Abstimmung der beiden ist Voraussetzung für die Fertilität des Mannes (10,39). Von den drei physiologischen Hauptvertretern der Östrogene, 17  $\beta$ -Östradiol ( $E_2$ ), Östron ( $E_1$ ) und Östriol ( $E_3$ ), ist 17  $\beta$ -Östradiol ( $E_2$ ) am effektivsten (40). Östradiol wird unter physiologischen Bedingungen aus Androgen gebildet (11,41,42). Das Enzym Aromatase (Cytochrom P 450) aromatisiert dabei Testosteron irreversibel zu Östradiol (s. Abb. 6).



**Abb. 6: Umwandlung von Testosteron in 17  $\beta$ -Östradiol ( $E_2$ ) durch Aromatase.** Modifiziert nach (43).

In Mausexperimenten konnte gezeigt werden, dass Aromatase-„Knockout“-Mäuse infertil sind und das Vorhandensein von Östradiol im Hoden unabdingbar für eine funktionierende Spermatogenese ist (44,45). Während bei fetalen und unreifen Tieren Östradiol vor allem von Sertoli-Zellen gebildet wird, überwiegt im ausgereiften Hoden die Produktion von Östradiol durch die Leydig-Zellen (44). Beim erwachsenen Mann konnte Aromatase in Leydig-Zellen, Sertoli-Zellen, in unreifen Keimzellen sowie in ejakulierten Spermatozoen nachgewiesen werden (40,42,46).

Bei der Wirkung von Östradiol auf die Hodenzellen unterscheidet man zwei verschiedene Signalwege: Einen langsamen genomischen Signalweg, der vorwiegend über die klassischen Östrogenrezeptoren (ESR 1 und ESR 2) vermittelt wird (weitere Ausführungen unter 1.7.), und einen schnellen Signalweg, der hauptsächlich über GPER vermittelt wird (weitere Ausführungen unter 1.9.) (10,47).

## **1.7. Der Östrogenrezeptor 1 und 2 (ESR 1/ESR 2)**

### **1.7.1. Entdeckung und Aktivierung von ESR 1 und ESR 2**

Die klassischen Östrogenrezeptoren ESR 1 und ESR 2 wurden in den 60er bzw. 90er Jahren entdeckt (48) und waren seitdem Objekt zahlreicher Experimente. ESR 1 und ESR 2 gehören der nukleären Rezeptorsuperfamilie an. Nach Bindung eines Liganden (z.B. Östradiol) ändern die Rezeptoren die Konformation und dimerisieren (49,50). Die Dimerisierung kann homolog (ESR 1/ESR 1 bzw. ESR 2/ESR 2) oder heterolog (ESR 1/ESR 2) erfolgen. Aktivierte, klassische Östrogenrezeptoren wirken vorwiegend über langsam ablaufende Reaktionswege (Stunden bis Tage) auf genomischer Ebene und führen zur Transkription bestimmter Zielgene. Dabei vermitteln sie ihre Wirkung entweder direkt durch Bindung an die DNS oder indirekt über die Aktivierung von Genexpressionsmodulatoren (49). Es gibt allerdings auch einige schnelle Reaktionswege (Sekunden bis Minuten), die durch membranständige ESR 1 und ESR 2 vermittelt werden (10,51).

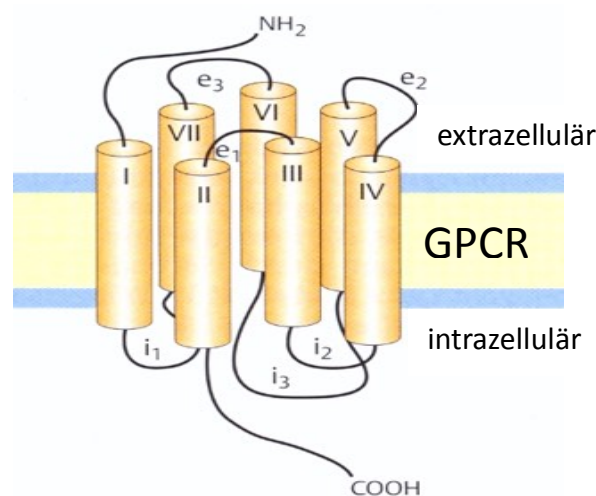
ESR 1 und ESR 2 gleichen einander strukturell und weisen große Ähnlichkeit in ihren Aminosäuresequenzen auf. Kleine Unterschiede an der Liganden-Bindungsstelle bewirken eine selektiv erhöhte Affinität der einzelnen Östrogenderivate für einen der beiden Rezeptoren (50).

### **1.7.2. ESR 1 und ESR 2-Vorkommen im männlichen Reproduktionstrakt**

Östrogenrezeptoren sind im menschlichen Körper in nahezu jedem Organsystem vorhanden, unter anderem auch im Reproduktionstrakt des Mannes (49,52). Während ESR 2 im humanen, männlichen Reproduktionstrakt nahezu ubiquitär vorkommt, wird beschrieben, dass ESR 1 lediglich von Leydig- und Sertoli-Zellen (49) bzw. in anderen Spezies auch von dem Epithel der Ductuli efferentes exprimiert wird (46). Dabei gibt es offenbar nicht nur Spezies-spezifische Unterschiede in der Expression von ESR 1/2, sondern auch individuelle Schwankungen (46). Darüberhinaus wurde eine Änderung der Rezeptorlokalisation je nach Alter des Versuchstiers beobachtet (49,53). Die genauen Expressionsorte von ESR 1 und ESR 2 im menschlichen Hoden sind also bis heute nicht vollständig geklärt.

### 1.8. G Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs)

G Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) sind definiert als Rezeptoren, die über Guanosin triphosphat-bindende Proteine wirken. Im menschlichen Körper stellen sie die größte Gruppe signalübertragender Moleküle dar (54). Üblicherweise sind G Protein-gekoppelte Rezeptoren mit sieben Helices in der Zellmembran (oder in den Endosomen) verankert (s. Abb. 7) und werden durch Bindung eines Agonisten, meist auf der Membranaußenseite, aktiviert (54–57).

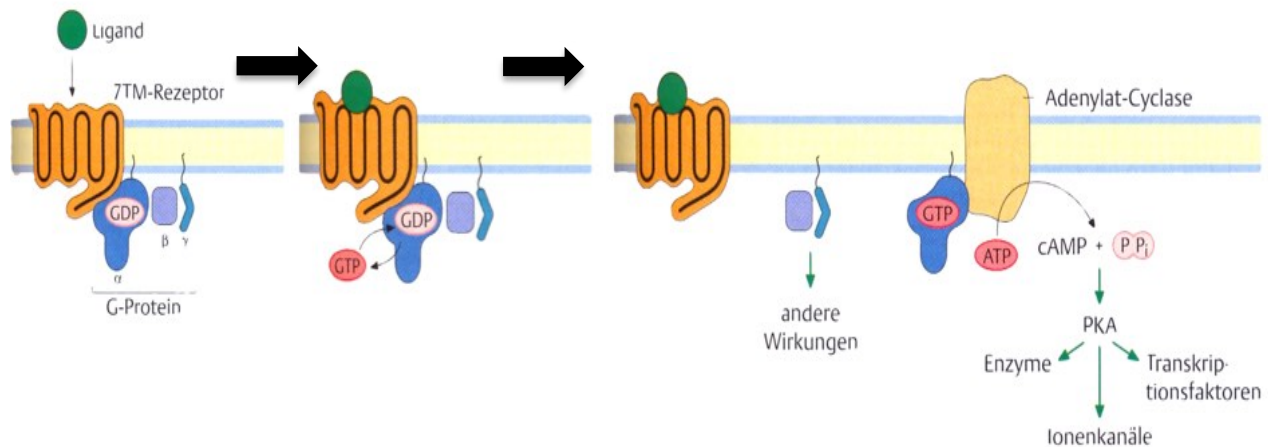


**Abb. 7: Struktur von G Protein-gekoppelten Rezeptoren.** Modifiziert nach (58).

G Protein-gekoppelte Rezeptoren sind heptahelicale in der Zellmembran verankert und haben spezielle extra- und intrazelluläre Ligandenbindungsstellen.

Die Aktivierung von GPCRs führt üblicherweise zum Ablauf schneller Signalwege innerhalb von Sekunden oder Minuten. Nach Agonistenbindung kommt es in der Zelle zu komplexen Vorgängen. Dabei werden intrazellulär gebundene, heterotrimere Guanin-Nukleotid-Bindungsproteine (G Proteine) durch den Austausch von GDP zu GTP an der  $\alpha$ -Untereinheit aktiviert. Durch die Bindung von GTP wird der G-Protein-Komplex instabil und dissoziiert in eine  $\alpha$ -Untereinheit und eine  $\beta$ - $\gamma$ -Untereinheit. Beide Untereinheiten können nachfolgende Signalkaskaden in Gang setzen (s. Abb. 8) (47,59).

Zum nachfolgenden Signalweg gehören unter anderem die Generierung von „Second Messengern“ wie cAMP, die Mobilisierung von Calcium, die Aktivierung von Kinasen oder die Transaktivierung von Wachstumsfaktor-Rezeptoren (54). Am Ende beeinflussen solche G Protein-übermittelten Signalkaskaden beispielsweise den Zellzyklus und das Zellwachstum (60).



**Abb. 8: Aktivierung G Protein-gekoppelter Rezeptoren.** Modifiziert nach (58).

Nach Bindung eines Liganden kommt es zur Konformationsänderung des GPCR und damit zum Austausch von GDP durch GTP am internen G Proteinkomplex. Durch die Bindung von GTP wird der G Proteinkomplex instabil und dissoziiert in die  $\alpha$ - und die  $\beta$ - $\gamma$ -Untereinheit. Beide Untereinheiten aktivieren nun weitere Signalkaskaden im Zellinneren und übermitteln so Liganden-abhängig Informationen.

Im Menschen sind bisher mehr als 800 solcher G Protein-gekoppelter Rezeptoren bekannt; ein großer Teil (mindestens 300) dieser Rezeptoren sind allerdings ausschließlich zur Signalübertragung für die Geruchswahrnehmung zuständig (56).

## 1.9. Der G Protein-gekoppelte Östrogenrezeptor (GPER)

### 1.9.1. Die Entdeckung von GPER

Zur Zeit der Entdeckung von GPER (ehemals GPR 30) in den 90er Jahren war der passende Ligand und somit die funktionelle Zugehörigkeit noch nicht bekannt. Die Wirkung von Östradiol ( $E_2$ ) war allerdings durch die klassischen Östrogenrezeptoren alleine nicht zu erklären. Im Jahr 2000 wurde GPER als primärer Vermittler der schnellen Östradiol-vermittelten Aktivierung von ERK 1/2 (extrazellulär regulierte Kinase) in der Zelle bekannt (61). Die Aktivierung von ERK 1/2 führt zum Ablauf von Signalkaskaden, die viele Zellprozesse wie beispielsweise den Zellzyklus, die Zellmigration oder den programmierten Zelltod beeinflussen (62). GPER reagierte also auf die Zugabe von Östradiol und rückte so als möglicher Rezeptor für Östradiol-vermittelte Effekte zunehmend ins Visier der Wissenschaft. Seit 2005 ist allgemein anerkannt, dass GPER tatsächlich ein Rezeptor ist, der vorwiegend Östradiol-abhängige Effekte vermittelt (47,54,56,59,63). Nach wie vor gibt es jedoch einige wenige Wissenschaftler die diesen Umstand anzweifeln. Levin et al. vertreten beispielweise die Auffassung, GPER

wirke lediglich in Anwesenheit von ESR 1 oder ESR 2 und sei somit kein eigenständiger Östrogenrezeptor (64). Inzwischen ist GPER von der „British Pharmacological Society“ (BPS) und der „International Union of Basic and Clinical Pharmacology“ (IUPHAR) als Östrogenrezeptor offiziell anerkannt.

### **1.9.2. Zelluläre Lokalisation und Funktion von GPER**

GPER ist ein heptahelicaler G Protein-gekoppelter Rezeptor, der überwiegend für die schnelle Zellantwort auf Stimulation mit Östradiol zuständig ist. In der großen Gruppe der G Protein-gekoppelten Rezeptoren gehört er funktionell den Rhodopsin-ähnlichen Rezeptoren bzw. der Klasse A an (65).

GPER ist im menschlichen Körper weit verbreitet. Die intrazelluläre Lokalisation ist bisher allerdings noch unklar. In einigen Studien wurde GPER in der Zellmembran (66) identifiziert, in anderen wiederum in der Membran des endoplasmatischen Retikulums (54,64). Die meisten Studien weisen auf eine Membran-gebundene Lokalisation von GPER hin (65). Chakrabati et al. hingegen fanden die Expression von GPER vorrangig im Zellkern des Endothels. Die Versuche wurden an kultivierten humanen Umbilikalvenen durchgeführt (63).

Darüberhinaus gibt es kontroverse Auffassungen zur Funktion von GPER. Ariazi et al. fanden eine GPER-vermittelte transiente  $\text{Ca}^{2+}$ -Erhöhung in Brustkrebszellen, die unabhängig von ESR 1 war (67). Auch Revankar et al. fanden eine intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisation in transfizierten Nierenzellen des Affen nach Stimulation von GPER. Zudem zog die Stimulation von GPER eine vermehrte Synthese von Phosphatidylinositol 3,4,5-Triphosphat nach sich, welche üblicherweise mit Zellwachstum und gesteigerter Überlebensfähigkeit der Zellen einhergeht (54). Chimento et al. hingegen wiesen eine Inhibition der Zellproliferation und eine vermehrte Apoptoserate nach Stimulation von GPER in Leydig-Tumorzellen der Ratte nach (68).

Bisher sind also weder der vorrangige Funktionsort, noch die vorrangige Funktionsweise oder der genaue Signalweg bekannt (65).

### **1.9.3. GPER-Vorkommen im männlichen Reproduktionstrakt**

Die wenigen Studien zu Expressionsorten von GPER im menschlichen Hoden kommen ebenfalls zu uneinheitlichen Ergebnissen: Einige Autoren konnten das Vorkommen von GPER in menschlichen Sertoli- und Leydig-Zellen zeigen (66,69); andere fanden die Expression von

GPER vorrangig in interstitiellen Zellen (70). Wieder andere Wissenschaftler vertreten die Ansicht, dass GPER zusätzlich von humanen Keimzellen exprimiert wird (66).

Diese studienabhängigen Unterschiede in der Bestimmung des Expressionsortes, sind mitunter dem Verwenden unterschiedlicher Antikörper (mit verschiedenen Bindungsstellen) geschuldet. Zudem existieren „Splice“-Varianten der Rezeptoren. Je nach Bindungsort der einzelnen Antikörper und der „Splice“-Varianten, können unterschiedliche Ergebnisse zustande kommen. Vermutlich spielen auch Spezies-spezifische Unterschiede eine Rolle.

#### **1.9.4. Liganden am GPER**

Viele Hormone wirken gleichzeitig über G Protein-gekoppelte Rezeptoren (z.B. GPER) und nukleäre Rezeptoren (z.B. ESR 1/2). So laufen nach der Stimulation mit Östradiol ( $E_2$ ) beide Signalwege (schnell und langsam) parallel ab und machen eine strikte Differenzierung unter physiologischen Bedingungen unmöglich (54–57). Mit der Herstellung des ersten selektiven GPER-Agonisten (G 1) wurde die Erforschung des neu entdeckten Östrogenrezeptors GPER entscheidend vorangetrieben (55,71). G 1 wirkt sehr spezifisch über GPER und beeinflusst ESR 1 oder ESR 2 erst ab einer Konzentration von 10  $\mu$ M (43,71). Kurz nach der Entdeckung von G 1 erfolgte auch die Identifikation eines spezifischen GPER-Antagonisten, G 15, welcher zur weiteren funktionellen Abklärung von GPER beitrug (47,72).

Obwohl neben Östradiol auch andere Liganden an GPER binden können, hat Östradiol gegenüber anderen Steroiden (z. B. Testosteron, Progesteron oder Cortisol) eine über 1000-mal stärkere Affinität zu GPER (47,55). Deshalb wird GPER mittlerweile funktionell eindeutig den Östrogenrezeptoren zugeordnet (47).

Endokrine Disruptoren, wie Östrogen-nachahmende Stoffe aus der Umwelt (Xenoöstrogene) stehen derzeit im Mittelpunkt des öffentlichen Interesses und werden beispielsweise mit Infertilität und der Entstehung bestimmter Krebsarten in Verbindung gebracht. Da die Affinität solcher Xenoöstrogene zu GPER bis zu 50 mal höher ist als zu den klassischen ERs, kommt der funktionellen Abklärung von GPER im Rahmen der Prävention von Erkrankungen besondere Bedeutung zu (47,51).

### 1.10. Studienziele

Ziel der vorliegenden Studie war es, das Vorkommen und die Funktion des G Protein-gekoppelten Östrogenrezeptors (GPER) im Hoden zu untersuchen. Ausgehend von der Arbeitshypothese, dass Östradiol über GPER die Fertilität beeinflussen kann, wurden folgende Fragen untersucht:

Welche Zellen im Hoden exprimieren GPER?

Gibt es Unterschiede in der GPER-Expression zwischen den Spezies Mensch, Affe, Ratte und Maus?

Ändert sich die zelluläre Lokalisation von GPER im Primaten-Hoden während der Entwicklung?

Gibt es einen Zusammenhang zwischen Fertilität bzw. Infertilität und der zellulären Expression von GPER im humanen Hoden?

Welche funktionelle Rolle spielt GPER für die humanen, peritubulären Hodenzellen?

## 2. Verwendete Materialien

### 2.1. Humanes Hodengewebe

Das in der vorliegenden Studie verwendete humane Hodengewebe wurde wie von C. Schell beschrieben (15) gewonnen und im Rahmen von Drittmittelprojekten in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Mayerhofer in Kooperation mit Prof. Schwarzer und Prof. Köhn aus München untersucht. Die ethische und rechtliche Unbedenklichkeit wurde im Rahmen der Drittmittelprojekte gesichert. Alle teilnehmenden Patienten haben der Verwendung ihrer Gewebeproben zu Studienzwecken vorab schriftlich zugestimmt. Ein positives Votum der Ethikkommission liegt vor.

So war es möglich, Proben von Patienten mit „Mixed Atrophy“-Syndrom (MA; n = 5), „Sertoli Cell Only“-Syndrom (SCO; n = 5) und „Germ Cell Arrest“-Syndrom (GA; n = 2) zu untersuchen. Das Alter der Patienten zum Zeitpunkt der Probenentnahme lag bei 27 bis 53 Jahren.

### 2.2. Hodengewebe vom Rhesusaffen

Die Gewebeproben vom Affen wurden uns von Prof. Urbanski aus dem Oregon National Primate Research Centre in Beaverton (USA) freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die Tiere wurden gemäß den Richtlinien des *National Research Council's Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* versorgt.

**Tab. 1: Tabelle über verwendete Gewebeproben von Rhesusaffen.**

Das Hodengewicht und der Testosterongehalt im Blut korrelieren mit dem Alter der Affen. Nicht vorhandene Daten wurden mit einem Gedankenstrich gekennzeichnet.

Alter	Gewicht	Gewicht Testis	Testosteron (Blut )
6 d	-	-	-
7 d	-	-	-
120 d	-	-	-
281 d	1,5 kg	0,18 g	0,27 ng/ml
1 y 306 d	3 kg	-	0,34 ng/ml
3 y 68 d	4,9 kg	1,45 g	0,44 ng/ml



4 y 248 d	5,8 kg	12 g	3,18 ng/ml
5 y	-	-	-
5 y 343 d	6,6 kg	9,8 g	0,95 ng/ml
6 y 274 d	6,4 kg	12,1 g	1,37 ng/ml

Das Hodengewebe wurde wie vorbeschrieben (73) post mortem gewonnen und entstammt unterschiedlichen Altersklassen vom neugeborenen bis zum erwachsenen Rhesusaffen (*Macaca mulatta*). Dabei wurden die Altersklassen wie folgt eingeteilt: 0-1 Jahr neugeboren bzw. infantil (n = 4), 1-2 Jahre juvenil (n = 1), 3-4 Jahre peripubertär (n = 2) und ab 5 Jahre erwachsen (n = 3). Die Experimente wurden vom *ONPRC Animal Care and Use Committee* genehmigt. Die Hodenentwicklung und der Testosterongehalt korrelierten mit dem Alter der Tiere (s. Tab. 1).

### 2.3. Hodengewebe von Maus und Ratte

Das in Paraffin eingebettete Hodengewebe von Maus und Ratte wurde wie von Mayerhofer et al. beschrieben (74) gewonnen und stand für immunhistochemische Studien zur Verfügung.

### 3. Methoden

Angaben zu Konzentrationen, Antikörpern, Lösungen und Geräten mit den jeweiligen Bezugsquellen finden sich im Anhang.

#### 3.1. Immunhistochemie

Zur Verfügung standen Hodengewebeproben von Menschen, Affen, Mäusen und Ratten, die in Bouin's Lösung fixiert und in Paraffin eingebettet waren. Die Paraffinblöcke wurden mit einem Mikrotom in 4 µm dicke Scheiben geschnitten und unmittelbar auf Objektträger (3-6 Schnitte pro Objektträger) aufgebracht.

Die Schnitte wurden mit Xylol entparaffinisiert und rehydriert, indem sie durch eine absteigende Alkoholreihe (Xylol und Isopropanol 100 %, 90 %, 80 % und 70 %) geführt wurden. Anschließend wurden sie zweimal für je 10 min in ein PBS-Bad (pH 7,4 ± 0,1) überführt, bevor sie zur Demaskierung der Antigene in 10 mM Citratpuffer für weitere 20 min in der Mikrowelle bei 400-800 Watt aufgekocht wurden. Nach dem Abkühlen wurden die Schnitte dreimal für je 5 min in PBS gewaschen. Dann wurde für 30 min 3 % Wasserstoff-Peroxid und 9 % Methanol aufgetragen und so die endogenen Peroxidasen blockiert. Im Anschluß daran wurden die Objektträger erneut im PBS (dreimal 5 min) gewaschen. Um unspezifische Antikörperbindungen zu reduzieren, wurden die Schnitte mit 5 % Normalserum (Ziege) für 30 min bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurde der primäre Antikörper gegen GPER (1:500, verdünnt in 5 % Normalserum) aufgetragen und die Objektträger über Nacht in einer feuchten Kammer bei 4° C gelagert. Details zu den Antikörpern sind in Tab. 5 zusammengefasst.

Am darauffolgenden Tag wurde nach erneutem Waschen mit PBS der biotinylierte Zweitantikörper (s. Tab. 6) zugegeben und die Schnitte für zwei Stunden in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur aufbewahrt. Nach einem weiteren Waschschrift (dreimal 5 min PBS) erfolgte die Inkubation mit ABC-Reagenz für 1-2 h. Anschließend wurde nochmal mit PBS und einmalig für 10 min mit Tris-Puffer/HCl (50 mM) gewaschen. Danach erfolgte die Färbung der Schnitte mit Diaminobenzidin (DAB) bis zur gewünschten Farbintensität. Die Reaktion wurde mit Hilfe von zweifach destilliertem Wasser abgestoppt. Um die Zellkerne anzufärben, wurden die Schnitte für drei Sekunden in Hämatoxylin eingetaucht und unter fließendem Leitungswasser bis zur gewünschten Bläuung gewaschen. Abschließend wurden die

Schnitte in aufsteigender Alkoholreihe (70 %, 80 %, 90 % und 100 % Isopropanol und Xylol) dehydriert und anschließend mit Hilfe von Entellan eingedeckelt.

Der verwendete GPER-Antikörper ist ein polyklonaler, kommerziell erhältlicher, gut charakterisierter Antikörper der Firma Sigma Prestige (Produktnummer HPA027052).

Für die Kontrollen wurde entweder der Erstantikörper weggelassen oder korrelierendes Normalserum verwendet. Die Dokumentation und Beurteilung erfolgte am Mikroskop (Axiovert 135, s. Tab. 3) bei 10-, 20-, 40- und 100-facher Vergrößerung. Auf die Präadsorption wurde verzichtet, da keine kommerziellen Peptide zur Verfügung standen.

### 3.2. DAPI-Färbungen

Mit Hilfe der DAPI-Färbung (fluoreszenzierender DNA-Färbung) wurden klar differenzierbare Mitosestadien (Meta-, Ana- und Telophase) (1) von kultivierten HTPCs ( $n = 3$ ) untersucht. Dazu wurden die Zellen zunächst auf sterile Glasplättchen in einer 24-Well-Platte ausgesät und für 24 h im Brutschrank belassen. Dann wurden die Zellen für 24 h in serumfreiem Medium kultiviert, bevor sie mit G 1 stimuliert wurden. Die Konzentration von G 1 ( $1 \mu\text{m}$ ) wurde entsprechend den Angaben der Literatur ausgewählt (71). Zu den Kontroll-Zellen wurde das G 1-Lösungsmittel DMSO in entsprechender Konzentration zugegeben.

Die so behandelten Zellen wurden zweimal mit ca. 500  $\mu\text{l}$  PBS gewaschen und dann mit 250  $\mu\text{l}$  Paraformaldehyd (PFA; 4 %) für 30 min bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend erfolgt ein erneuter Waschschrift (dreimal 5 min) mit warmen PBS und einmal 10 min mit zweifach destilliertem Wasser. Dann wurden die Plättchen herausgelöst und nach kurzer Trocknungsphase (5-10 min bei Raumtemperatur) im Dunkeln mit DAPI-haltigem Medium auf einem Objektträger fixiert. Kerne und Mitosestadien von über 100 Zellen pro Glasplättchen konnten nun unter dem Fluoreszenzmikroskop (Axiovert, s. Tab. 3) beurteilt und dokumentiert werden.

### 3.3. Immunfluoreszenz-Doppelfärbung

Mit Hilfe von Fluoreszenzmarkierungen wurde untersucht, ob Mastzellen GPER exprimieren. Dazu wurden die humanen Hodenproben ( $n = 4$ ) wie in 3.1. beschrieben, auf Objektträger aufgebracht, in absteigender Alkoholreihe entparaffinisiert und für 10 min in PBS gebadet. Dann wurden die Schnitte dreimal 10 min mit KPBS gewaschen und einmal 10 min mit LKPBS

vorinkubiert, bevor eine Lösung aus  $\alpha$ -GPER (1:250, polyklonal, Kaninchen, s. Tab. 5) und  $\alpha$ -TRY (1:500, monoklonal, Maus, s. Tab. 5) in LKPBS zugegeben wurde. Die Schnitte wurden über Nacht bei 4° C in einer feuchter Kammer gelagert. Am folgenden Tag wurde erneut dreimal 10 min mit KPBS gewaschen und eine Mischung der fluoreszenzmarkierten Zweitantikörper aus IgG-Cy 3 ( $\alpha$ -Kaninchen, rot) und IgG-FITC ( $\alpha$ -Maus, grün) in einem Verhältnis von 1:250 (in LKPBS) für eine Stunde bei Dunkelheit auf die Schnitte gegeben. Anschließend wurde dreimal 10 min mit KPBS und einmal mit zweifach destilliertem Wasser im Dunkeln gewaschen bevor die Schnitte eingedeckt wurden. Mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops und dessen Absorptionsfilter bei 485 nm (FITC) bzw. 548 nm (Cy 3) und Emissionsfilter bei 514 nm (FITC) bzw. 651 nm (Cy 3) erfolgte die Beurteilung und Dokumentation der Schnitte. Zur Auswertung wurden die Bilder mit Hilfe des Programms Adobe Photoshop CS 3 (s. Tab. 12) übereinandergelegt und kontrastadaptiert.

### **3.4. Zellkultur**

#### **3.4.1. Kultivierung von HTPCs**

In der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Mayerhofer standen humane, peritubuläre Zellen zur Verfügung (75). Diese Zellen wurden in Kulturgefäße (Petrischalen mit 21 cm<sup>2</sup> Grundfläche, 25 cm<sup>2</sup>-Flaschen oder 75 cm<sup>2</sup>-Flaschen) ausgesät, mit serumhaltigem DMEM (+ 1 % Penicillin/Streptomycin) bedeckt und im Brutschrank bei 37° C und 5 % CO<sub>2</sub>-Zufuhr aufbewahrt. Alle zwei bis vier Tage wurde das Medium gewechselt. Sobald die Zellen konfluent waren, wurden sie „gesplittet“. Dafür wurde zunächst das Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen durch Zugabe einer Trypsin/EDTA-Lösung abgelöst. Die durch Trypsin ausgelöste Reaktion wurde durch Zugabe der doppelten Menge von serumhaltigem DMEM wieder abgestoppt. Anschließend wurde die Zellsuspension in ein geeignetes Gefäß übergeführt und bei 1000 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das am Boden haftende Zellpellet je nach Größe in einer passenden Menge Medium resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen in neue Plastikgefäße ausgesät oder zur Messung in einem automatisierten Zellzählsystem (CASY, s. 3.6.1) verwendet.

### **3.4.2. Zellstimulation**

Vor jeder Stimulation wurden die Zellen für 24 h im serumfreien Medium inkubiert. Dieser Vorgang arretiert den Zellzyklus weitgehend. Nach Absaugen des Mediums wurde G 1 (spezifischer Agonist von GPER) in verschiedenen Konzentrationen (10 nM – 100 µM) zugegeben. Da G 1 in DMSO gelöst wird, diente als Kontrolle stets eine zweite Zellcharge, die mit der korrelierenden Konzentration DMSO (0,01 %) versetzt wurde.

## **3.5. Proteinbiochemische Methoden**

### **3.5.1. Proteinextraktion und Konzentrationsbestimmung**

Zur Extraktion von Protein aus den HTPCs wurden die kultivierten und stimulierten Zellen zunächst einmalig mit PBS gewaschen und dann bei -80° C weggefroren. Mit Hilfe eines Zellschabers wurden die gefrorenen Zellen in gekühltem NPE-Puffer abgelöst und in ein Eppendorfgefäß überführt. Anschließend wurden die Zellen für drei Minuten bei 4° C und 10.000 rpm abzentrifugiert und der Überstand entfernt. Das Zellpellet wurde in 1,5 ml PBS resuspendiert und erneut unter denselben Rahmenbedingungen abzentrifugiert. Je nach Größe des Zellpellets wurden 50-100 µl Proteaseinhibitor (Inhibitorcocktail, s. Tab. 8) zugegeben und die Zellen im Anschluß durch Ultraschallzertrümmerung aufgeschlossen.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde der DC Protein Assay (s. Tab. 8) verwendet. Basierend auf der Bradford-Methode wurde zunächst die Absorption einer standardisierten Lösungsreihe mit definierten Proteinkonzentrationen bei 650-750 nm im ELISA-Reader gemessen. Anschließend wurden die Proben anhand der Standardreihe mit Hilfe von Prism Graphpad (s. Tab. 12) bestimmt.

### 3.5.2. Western Blot

#### 3.5.2.1. SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE)

Für die Western Blot-Analyse wurde zunächst das benötigte Gel gegossen. Dafür wurden als erstes die Glasplatten gereinigt und in die Gießkammer eingebaut.

**Tab. 2: Zusammensetzung der Acrylamidgele zur Gelelektrophorese.**

Zutaten	Trenngel (12 %)	Sammelgel
30 % Acrylamid	2600 µl	450 µl
4 x Trenngel-Puffer pH 8,8	1625 µl	-
Sammelgel-Puffer pH 6,8	-	750 µl
Aqua bidest	2275 µl	1775 µl
TEMED	13 µl	7,5 µl
10 % APS	26 µl	12,5 µl

Dann wurde die Trenngel-Grundlage (s. Tab. 2) eingefüllt, mit Isopropanol überschichtet und 30 min bei Raumtemperatur gelagert, bis eine vollständige Polymerisation stattgefunden hat. Anschließend wurde das Isopropanol abgegossen und durch die Sammelgel-Grundlage (s. Tab. 2) ersetzt. Unmittelbar danach wurde ein Kamm als Platzhalter für die späteren Taschen eingesetzt. Nach weiteren 30 min wurde das Gel entweder direkt verwendet oder eingehüllt in feuchte Tücher bei 4° C bis zu einer Woche aufbewahrt.

Um überall dieselbe Probenmenge aufzutragen, wurde für jede einzelne Probe die benötigte Menge für 10 µg Protein pro Probentasche berechnet. Die Proben wurden in 0,5 ml Eppendorfgefäße übergeführt. Nach Zugabe von je 10 %  $\beta$ -Mercaptoethanol und Bromphenolblau wurden die zentrifugierten Proben bei 95° C für 5 min denaturiert und anschließend erneut zentrifugiert, um eventuelle Kondensflüssigkeit am Deckelrand mitzuerfassen.

Die Gele wurden in die Elektrophoresekammer eingesetzt und die Kammer mit Laufpuffer (Laemmlipuffer, s. Tab. 10) aufgefüllt. Bevor die Proben in die Taschen eingefüllt werden konnten, wurden die Kämme unter Pufferniveau herausgezogen. Pro Gel wurde mindestens ein Marker zum Abgleich des Molekulargewichts aufgetragen. Die Elektrophoresekammer wurden bei 90 Volt angeschlossen und nach Einlaufen des Proteins in das Trenngel wurde die Spannung auf 190 Volt erhöht. Sobald das Protein vollständig durch das Gel gelaufen war wurde der Lauf beendet und das Gel aus den Glasplatten gelöst.

### **3.5.2.2. Blotting**

Die vorher nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennten Proteine, wurden im Blotverfahren auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Dazu erfolgte zunächst die Äquilibration des Gels und der Nitrocellulosemembran im Blotpuffer (Transferpuffer) für 10-15 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurden Gel und Membran zusammen mit Filterpapier und Schwamm in die Gelhaltekassette eingesetzt. Nach Einsetzen der Gelhaltekassette in die Transferkammer wurde die Kammer mit Transferpuffer aufgefüllt. Die Kammer wurde für 75 min bei 100 Volt angeschlossen. In diesem elektrischen Feld wurde das Protein auf die Membran transferiert. Nach Ausbau der Membran konnte mit Hilfe einer reversiblen Ponceau S-Färbung der Erfolg des Transfers sichtbar gemacht werden.

### **3.5.2.3. Inkubation der Membran und Auswertung**

Direkt nach der Färbung mit Ponceau S wurde die Membran in ein Plastikgefäß gelegt und mit TBS-Tween (+5 % fettfreiem Milchpulver) für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur auf den Schüttler gestellt. Dieser Schritt diente der Absättigung eventueller, unspezifischer Bindungsstellen. Gleichzeitig wurde Ponceau S wieder abgewaschen. Nach Entfernen der Milchpulversuspension wurde der Primärantikörper (s. Tab. 5) in TBS-Tween (+ 2,5 % Milchpulver) aufgetragen und über Nacht bei 4° C auf niedrigster Schüttlerstufe inkubiert.

Am darauffolgenden Tag wurde nach Waschen mit TBS-Tween der Zweitantikörper (s. Tab. 6) mit TBS-Tween (2,5 %) verdünnt und auf die Membran aufgetragen.

Die Membran wurde für mindestens 1 h bei Raumtemperatur auf niedrigster Schüttlerstufe mit dem Zweitantikörper inkubiert. Es erfolgte ein weiterer Waschschriff mit TBS-Tween bevor die Membran zur Auswertung verwendet wurde. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software ImageJ und mit Prism Graphpad (s. Tab. 12).

## **3.6. Zellviabilität**

### **3.6.1. CASY – „Cell Counter and Analyzer“ System**

CASY ist ein etabliertes, automatisiertes Zellzählssystem, dass mit Hilfe eines elektrischen Feldes Zellen auszählen und ihre Vitalität bestimmen kann. Lebende Zellen haben eine unversehrte Plasmamembran, während die Membran von toten Zellen permeabel ist. Da nur

vitale Zellen elektrisch isolieren kann CASY zwischen toten und lebendigen Zellen unterscheiden. Zudem kann CASY die Größe der Zellen bestimmen: Je größer die Zellen, desto besser bleibt das elektrische Signal erhalten. Die Ergebnisse jeder einzelnen Zelle werden kumuliert und einer kalibrierten Mehrkanalanalyse mit über 500.000 Kanälen zugeordnet.

Ein Profil typischer HTPC-Charakteristika im Hinblick auf den Zelldurchmesser und die Kerngröße ist notwendig für den Abgleich und war bereits aus Vorversuchen vorhanden. Für die Messung im CASY wurden die kultivierten Zellen zunächst mit Trypsin behandelt (s. 3.4.1) und in ein geeignetes Plastikgefäß überführt. Dann wurde durch Zentrifugation ein Zellpellet gewonnen, welches in 1 ml PBS resuspendiert wurde.

Unter ständigem Schütteln wurden 20 µl der Suspension entnommen und in 10 ml spezieller Messlösung (CasyTon, s. Tab. 9) gelöst. Nach drei Messvorgängen im CASY wurden folgende gemittelte Werte angezeigt: Die absolute Zellzahl (bei einer Verdünnung von 1:500), die Anzahl der lebenden Zellen, die Zellviabilität in Prozent und die durchschnittliche Zellgröße. Anhand dieser Werte war nach 24 h Stimulation mit G 1 bzw. DMSO eine Auswertung im Hinblick auf die Zellproliferation möglich. Zudem konnten so eine vorher definierte Anzahl an Zellen gezielt ausgesät werden. Das Säulendiagramm (s. Abb. 20) wurde mit Hilfe von „Prism Graphpad“ (s. Tab. 12) erstellt.

### 3.6.2. Intrazelluläre $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration

In der GPER-vermittelten Signaltransduktion wurde  $\text{Ca}^{2+}$  als Signalmolekül beschrieben (54). Um HTPCs hinsichtlich ihres  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstiegs nach Zugabe von G 1 bzw.  $\text{E}_2$  zu beurteilen, wurden die Zellen vor der Messung auf runde, Poly-L-Lysin-beschichtete Deckgläschen von 12 mm Durchmesser ausgesät. Nach Adhärenz wurden das serumhaltige Medium + 1 % Penicillin/Streptomycin entfernt und durch Medium ohne Zusätze ersetzt. 24 h später wurde das Medium abgesaugt und im Dunkeln neues Medium mit Zusatz von 5 µM Pentaacetoxy-Methylester (Fluo-4 AM) zugegeben. Fluo-4 AM ist ein Farbstoff der ins Zellinnere gelangt und dort hydrolysiert und damit gebunden wird.

Nach 30 min Inkubationszeit im Brutschrank wurden die Zellen mit serumfreiem Medium gewaschen und anschließend auf den Trägertisch des konfokalen Mikroskops (Leica, s. Tab. 3) befestigt. Dann wurde eine zur Messung geeignete Stelle mit mehreren gut differenzierbaren Zellen ausgewählt und ein Mikropumpensystem angeschlossen. Im Dunkeln wurde mit einem Argon-Laser-System alle 2 s ein Fluoreszenzbild aufgenommen. Bei Bin-



dung von Fluo-4 an  $\text{Ca}^{2+}$  ergibt sich ein Fluoreszenzsignal mit einem Maximum bei 494 nm. Je mehr  $\text{Ca}^{2+}$  gebunden wurde, desto intensiver war das Fluoreszenzsignal.

Durch das Mikropumpensystem wurde den Zellen in aufsteigender Konzentration G 1 zwischen 10 nM und 3  $\mu\text{M}$  G 1 ( $n = 4$ ) oder  $\text{E}_2$  zwischen 1 nM und 1  $\mu\text{M}$  ( $n = 3$ ) über einen definierten Zeitraum zugeführt. Nach jeder Stimulation erfolgte zur Erholung der Zellen die Zugabe von stimulationsfreiem Medium. Als Negativkontrolle diente die Verabreichung der jeweiligen Lösungsmittel: DMSO für G 1 und Ethanol für  $\text{E}_2$ . Um die Zellen auf ihre Vitalität und Funktionalität zu prüfen (Positivkontrolle) wurde Histamin zugegeben, was stets zu einem Anstieg der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration führte. Veränderungen des Fluoreszenzsignals wurden mit Hilfe eines konfokalen Fluoreszenzmikroskops während und nach der Zugabe von G 1 in aufsteigenden Konzentrationen in ausgewählten Arealen ausgewertet. Diagramme wurden mit Prism Graphpad (s. Tab. 12) erstellt.

### 3.6.3. „Live Cell Imaging“

In der Messkammer (Ibidi, s. Tab. 3) wurden die Zellen über 24 h beobachtet. Zunächst wurden die Zellen mit Hilfe von CASY in definierter Zahl auf spezielle Kulturgefäße mit Glasboden (Ibidi, s. Tab. 4) ausgesät. Nach 24 h waren die Zellen adhärent und das serumhaltige Medium (+ 1 % Penicillin/Streptomycin) wurde durch serumfreies Medium ersetzt. Nach weiteren 24 h wurde neues Kulturmedium mit G 1 (1  $\mu\text{M}$ ; gelöst in DMSO) zugegeben. Unmittelbar danach wurden die Zellen in die Messkammer eingebracht. Um festzustellen, ob sich die Reaktion der Zellen auf G 1 (spezifischer Agonist am GPER) durch G 15 (spezifischer Antagonist am GPER) blockieren lässt, wurde in einem weiteren Experiment vor der Stimulation mit G 1 (1  $\mu\text{M}$ ) für 30 min G 15 (1  $\mu\text{M}$ , gelöst in DMSO) in derselben Konzentration zugegeben.

Die Messkammer ist ein geschlossenes System mit definierten Bedingungen: 5 %  $\text{CO}_2$ -Gehalt, Deckel und Boden sind gleichermaßen beheizt (ca. 37° C). Die Kammer ist auf einem inversen Mikroskop (s. Tab. 3) angebracht, mit welchem zunächst eine für die Messung geeignete Stelle ausgewählt wurde. Dann wurde für 24 h alle 10 min ein Bild aufgenommen. Die Bilderfolge konnte im Anschluß mit iMovie (s. Tab. 12) zusammengefügt und ausgewertet werden.

### 3.7. Statistik

Alle Versuche wurden mindestens dreimal wiederholt. Alle Werte entsprechen Mittelwerten und Diagramme wurden mit Hilfe von Prism Graphpad 4.0 (s. Tab. 12) erstellt. Um zwei Gruppen zu vergleichen wurde der Student's t-test benutzt. Als signifikant wurde eine Wahrscheinlichkeit  $p < 0,05$  angenommen.

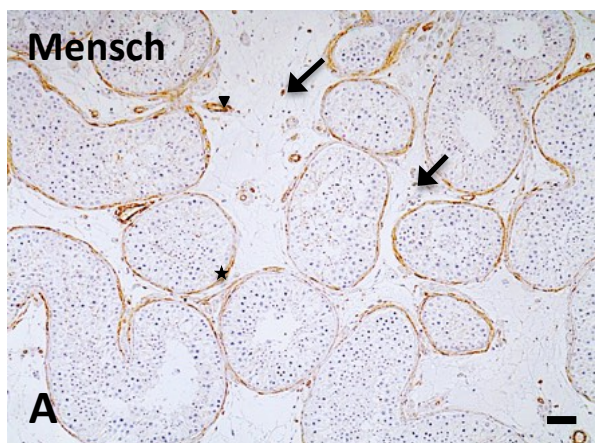
## 4. Ergebnisse

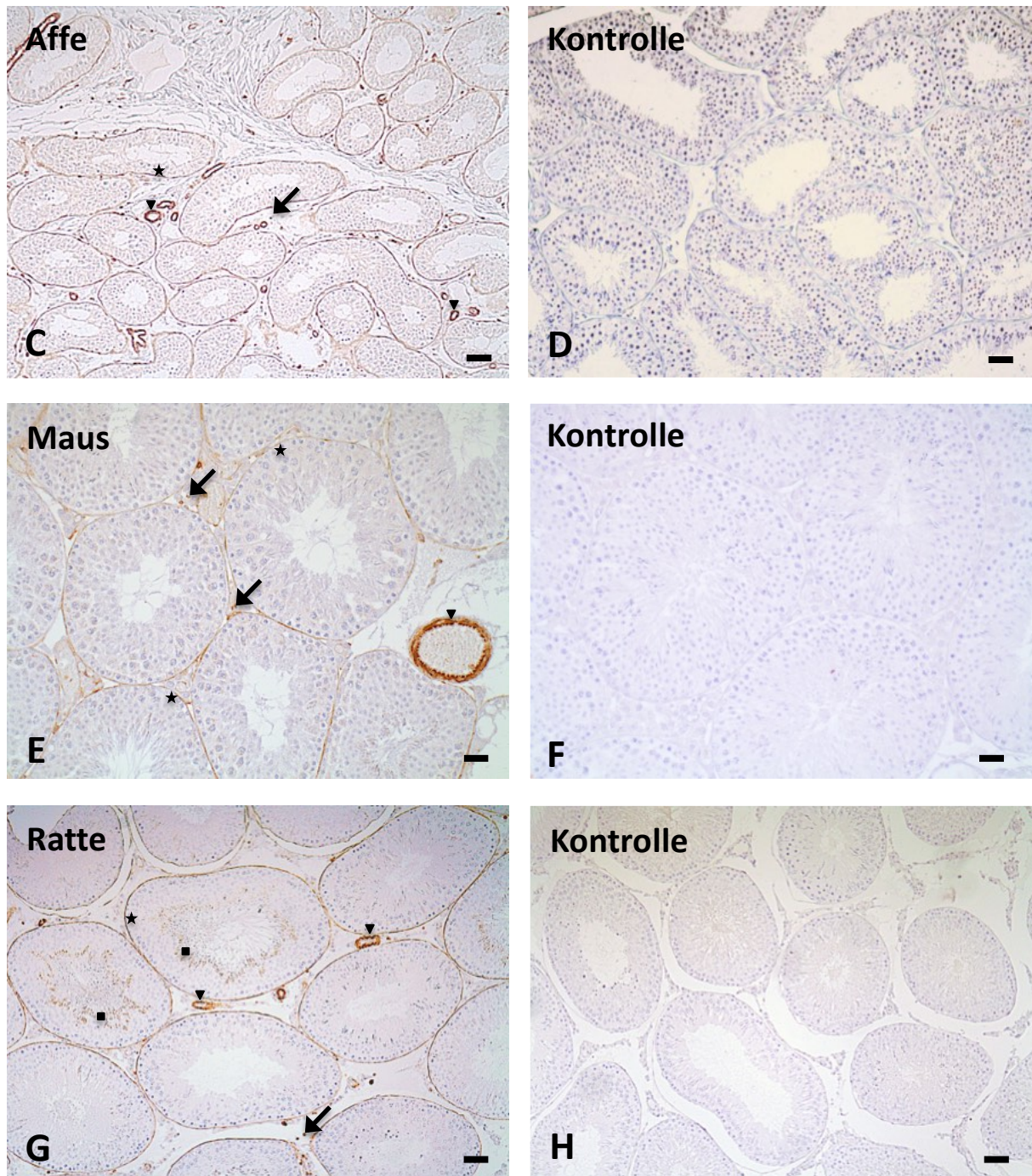
### 4.1. GPER-Expression im Hoden von Primaten und Nagern

Zunächst wurde die Expression von GPER an adultem Hodengewebe verschiedener Spezies (Mensch  $n = 4$ ; Affe  $n = 3$ ; Maus  $n = 6$ ; Ratte  $n = 3$ ) untersucht. Die immunhistochemischen Färbungen zeigten bei adulten Individuen speziesübergreifend ein ähnliches Ergebnis: Der Östrogenrezeptor GPER wird vorwiegend im Bereich der peritubulären Zellen der Samenkanälchen (Sternchen, s. Abb. 9 A, C, E, G) exprimiert. Daneben waren bei allen Spezies einzelne, interstitiell gelegene Zellen GPER positiv (Pfeile, s. Abb. 9 A, C, E, G).

Insbesondere die Gewebeproben von Mensch und Rhesusaffe (s. Abb. 9 A-D) sind sich im zellulären Schichtaufbau ihrer tubulären Wände und damit auch in der immunhistochemischen Färbung sehr ähnlich. GPER-Färbungen an testikulären Schnitten der Ratte zeigten zusätzlich eine Anfärbung der lumennahen Spermatozyten (Quadrat, s. 9 G). Diese Beobachtung wurde in den immunhistochemischen Färbungen ausschließlich bei Gewebeproben von Ratten gemacht.

Die Glattmuskelwände der kleinen und kleinsten Gefäße im Hoden jeder Spezies zeigten sich durchweg positiv für GPER und dienen somit als intrinsische Positivkontrolle (Pfeilspitzen, s. Abb. 9 A, C, E, G). Die Negativkontrollen wurden entweder ohne Erstantikörper (s. Abb. 9 D) oder mit Normalserum (und IgG) durchgeführt (s. Abb. 9 B, F, H). Sie blieben stets ungefärbt.





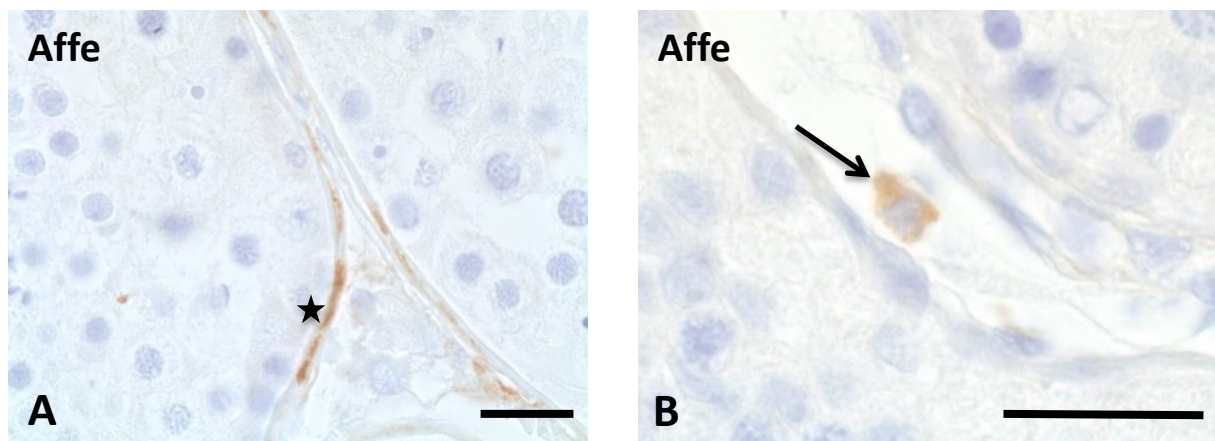
**Abb. 9: Immunhistochemische Färbung von Hodenschnitten des Menschen (A, B), des Rhesusaffen (C, D), der Maus (E, F) und der Ratte (G, H) mit  $\alpha$ -GPER.**

Alle Abbildungen zeigen eine überwiegend peritubuläre Expression von GPER (Sternchen, A, C, E, G). Zudem sind einige interstitielle Zellen GPER-positiv (Pfeile, A, C, G, E). Die Gefäßwände der Arteriolen entsprechen intrinsischen Positivkontrollen (Pfeilspitzen, A, C, G, E). Bei der Ratte sind zusätzlich lumennahe Spermatozoen GPER-positiv (Quadrate, G). B, D, F und H entsprechen den jeweiligen Kontrollen: Ohne Erstantikörper (D) oder mit Normalserum (B, F, H). Alle Schnitte wurden mit Hämatoxylin gegengefärbt. Skalierungsbalken ca. 50  $\mu$ m.



#### 4.2. Lokalisation von GPER im Hoden

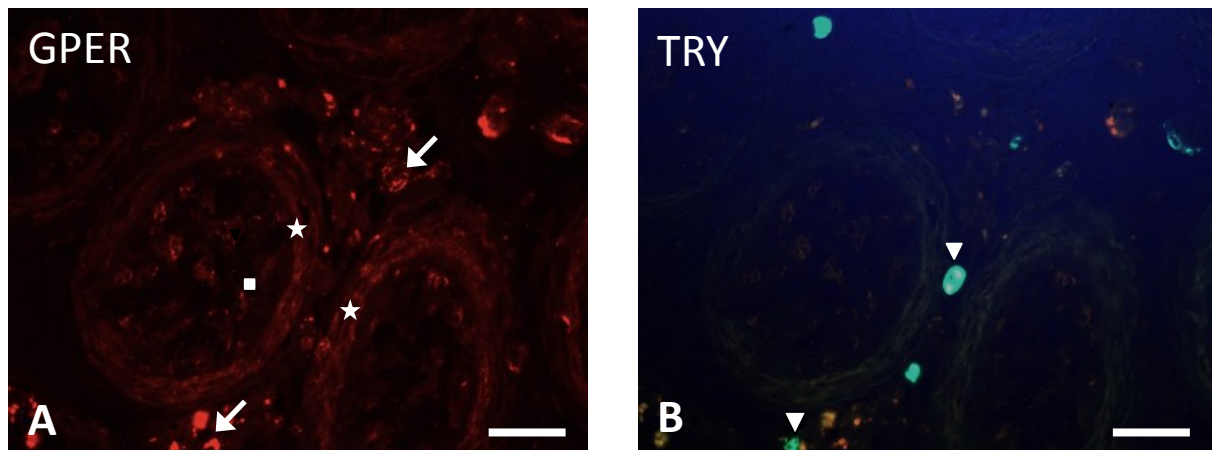
Um die genaue Lokalisation von GPER im Hoden zu ermitteln, wurden die Gewebeschnitte verschiedener Spezies zusätzlich in 100-facher Vergrößerung betrachtet (gezeigt wird Affengewebe, s. Abb. 10 A, B). Die zytoplasmatische Anfärbung der peritubulären Zellen (Sternchen, s. Abb. 10 A) ist deutlich zu erkennen. Die Anfärbung des Zytoplasmas interstitieller Zellen ist in Abbildung 10 B dargestellt (Pfeil, s. Abb. 10 B).



**Abb. 10: Immunhistochemische Färbung von Hodenschnitten des Affen mit  $\alpha$ -GPER.**

Darstellung der zytoplasmatischen Lokalisation von GPER in peritubulären Zellen (Sternchen, A) und in interstitiellen Zellen (Pfeil, B). Die Schnitte wurden mit Hämatoxylin gegengefärbt. Skalierungsbalken ca. 20  $\mu$ m.

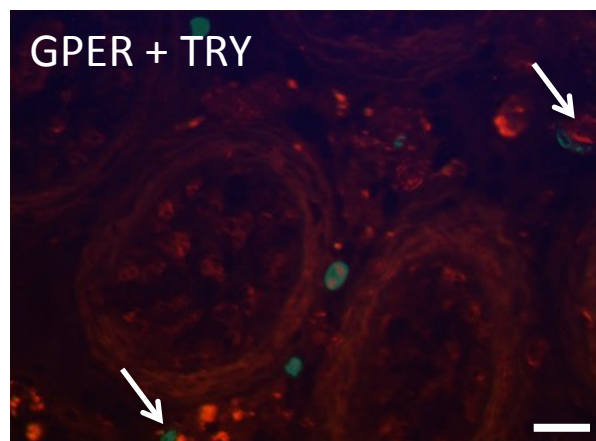
Zur Abklärung, ob es sich bei den interstitiellen, GPER-positiven Zellen um Zellen der Immunabwehr (Mastzellen) handelt, wurde an humanem Hodengewebe eine Immunfluoreszenz-Doppelfärbung mit GPER (rot; s. Abb. 11 A) und Mastzelltryptase (TRY, grün; s. Abb. 11 B) durchgeführt ( $n = 4$ ). Mastzelltryptase ist ein spezifischer Mastzellinhaltsstoff. Die Abbildung 11 A zeigt einen Hodenschnitt mit fluoreszenzmarkiertem Zweitantikörper. Wie zuvor in der immunhistochemischen Anfärbung mit nicht-fluoreszenzmarkiertem Zweitantikörper gegen  $\alpha$ -GPER (s. Abb. 9 A, C, E, G) stellten sich die peritubulären Zellen (Sternchen, s. Abb. 11 A) sowie einige der interstitiellen Zellen (Pfeile, s. Abb. 11 A) deutlich GPER-positiv dar. Anders als in den immunhistochemischen Vorversuchen waren zusätzlich auch einige Zellen innerhalb der Tubuli GPER-positiv (Quadrat, s. Abb. 11 A). In Abbildung 11 B sind die Mastzelltryptase-haltigen Zellen desselben Hodenschnitts grün dargestellt. Es sind ausschließlich einige der interstitiellen Zellen angefärbt (Pfeilspitzen, s. Abb. 11B).



**Abb. 11: Fluoreszenzduplexfärbung humaner Hodenschnitte mit  $\alpha$ -GPER und  $\alpha$ -Mastzelltryptase.**

GPER wird in den peritubulären Zellen (Sternchen, A), in Zellen des Keimepithels (Quadrat, A) und in interstitiellen Zellen (Pfeile, A) exprimiert. Mastzelltryptase (grün, B) hingegen wird ausschließlich in interstitiell gelegenen Mastzellen (Pfeilspitzen, B) exprimiert. Skalierungsbalken ca. 50  $\mu$ m.

Eine großflächige Überlappung der Expression von GPER und Mastzelltryptase konnte nicht festgestellt werden (vgl. Abb. 11 A und B). Durch Überlagerung und Fusion der beiden Bilder mit Hilfe des Programms Adobe Photoshop erkennt man sehr vereinzelt interstitielle Zellen, die GPER und Mastzelltryptase koexprimieren (s. Abb. 12, Pfeile).

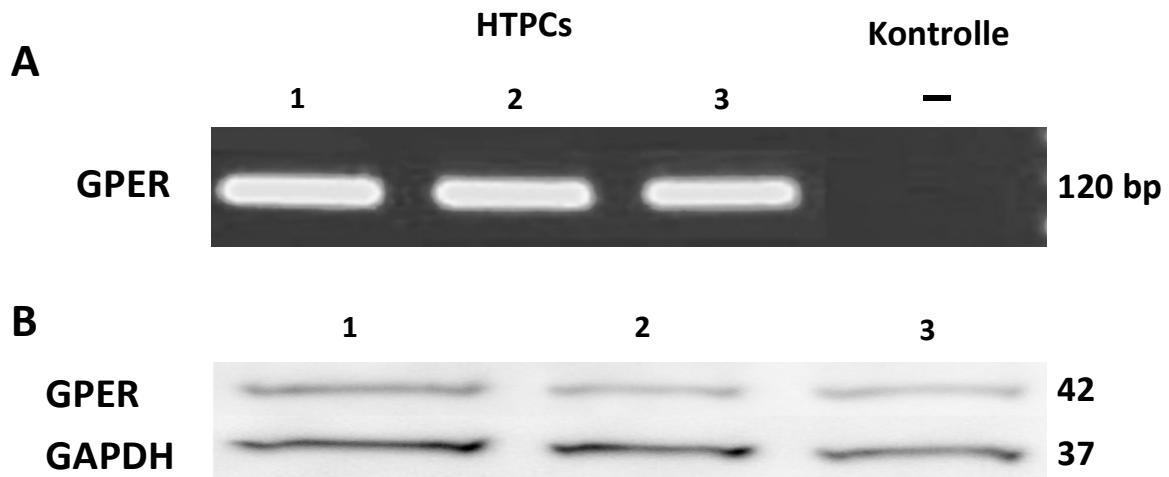


**Abb. 12: Überlagerung und Fusion der Abb. 11 A und 11 B.**

Es zeigt sich eine Koexpression von GPER und Mastzelltryptase in nur wenigen interstitiellen Zellen (Pfeile). Skalierungsbalken ca. 50  $\mu$ m.

Um die Expression von GPER genauer zu untersuchen, standen außer den Gewebeschnitten auch Zellkulturen von humanen peritubulären Hodenzellen zur Verfügung. RT-PCR-Experimente, die für diese Arbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Mayerhofer durchgeführt wurden, konnten die Expression von GPER (120 bp) durch HTPCs (s. Abb. 13 A) an drei verschiedenen Patienten bestätigen (sequenziertes PCR-Produkt).

Western Blot-Experimente (s. Abb. 13 B) zeigten die erwartete Bande der HTPCs von zwölf verschiedenen Proben (gezeigt werden drei Proben) auf der für GPER-typischen Höhe bei 42 kDa. Als Ladungskontrolle wurde GAPDH (37 kDa) eingesetzt. Bei der GPER-Expression konnten quantitative, interindividuelle Unterschiede zwischen den einzelnen Proben festgestellt werden.



**Abb. 13: Bestätigung der Expression von GPER in kultivierten HTPCs dreier Individuen (1-3) durch PCR (A) und Western Blot (B).**

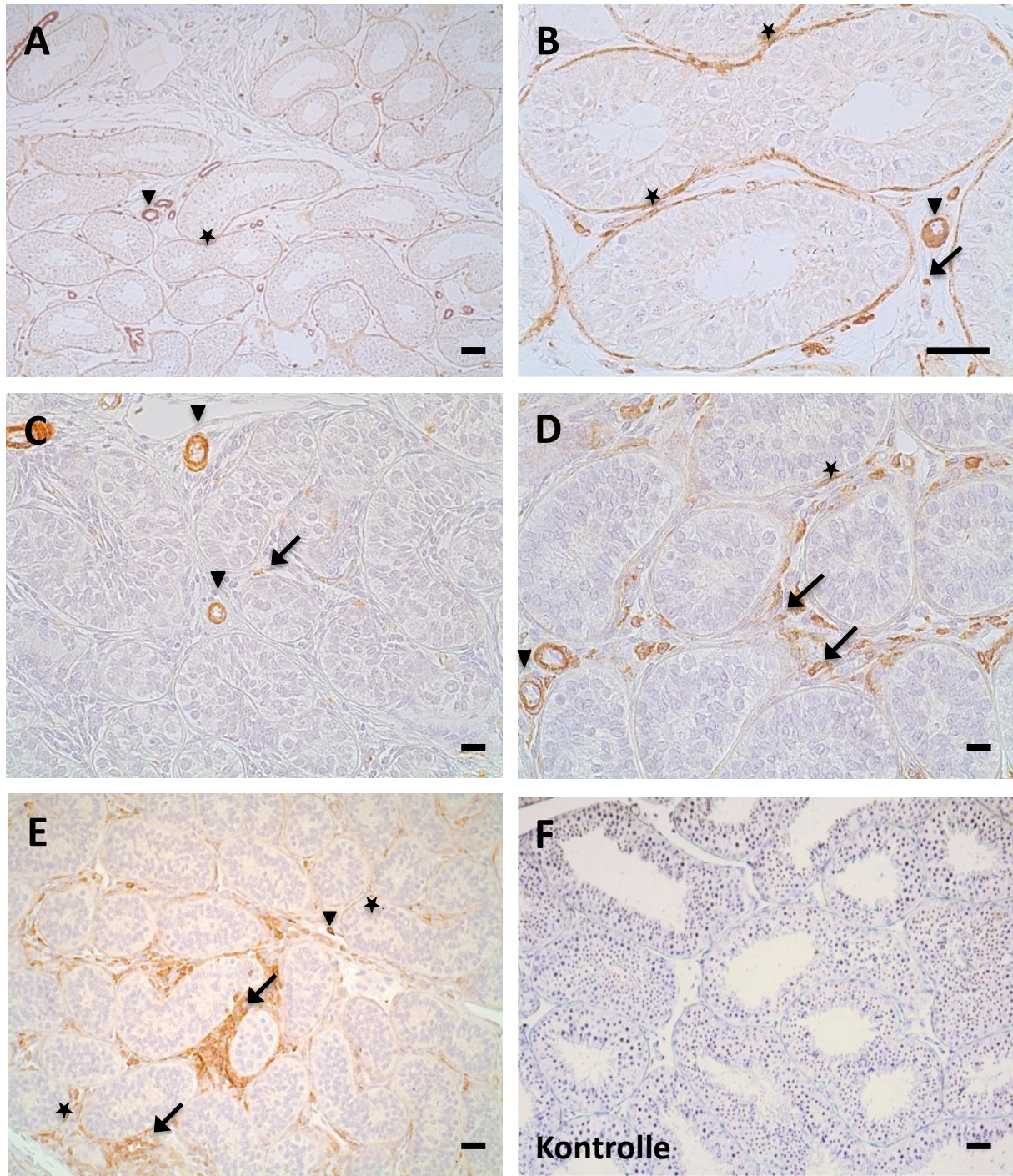
A: Die Negativkontrolle (–) enthält RNA anstatt cDNA. B: Als Ladungskontrolle wurde GAPDH (37 kDa) verwendet.

#### 4.3. Altersabhängige GPER-Expression beim Affen

Zur Untersuchung der GPER-Expression bei der postnatalen Hodenreifung wurde Affengewebe verwendet. Wie in den Abbildungen 9 A und 9 C zu sehen, entspricht die Expression von GPER im Hoden von adulten Rhesusaffen phänotypisch der des Menschen. Wie beim Menschen sind auch beim Rhesusaffen überwiegend peritubuläre Zellen angefärbt (Sternchen, s. Abb. 14 A und B). Die Untersuchung verschiedener Reifegrade des Primatenhodens zeigte, dass erst mit der Pubertät und beginnender Spermatogenese sowie Testosteronproduktion das bekannte GPER-Expressionsmuster in den peritubulären Zellen entsteht.

Die Abbildungen 14 A und B zeigen immunhistochemische Färbungen mit  $\alpha$ -GPER des adulten, geschlechtsreifen Affen ( $n = 3$ ; s. Abb. 14 B als Vergrößerung von Abb. 14 A). Bei infantilen Affen ( $n = 4$ , s. Abb. 14 C) exprimierten die peritubulären Zellen kaum bis überhaupt kein GPER.





**Abb. 14: GPER-Expression während der Entwicklung des Rhesusaffen.**

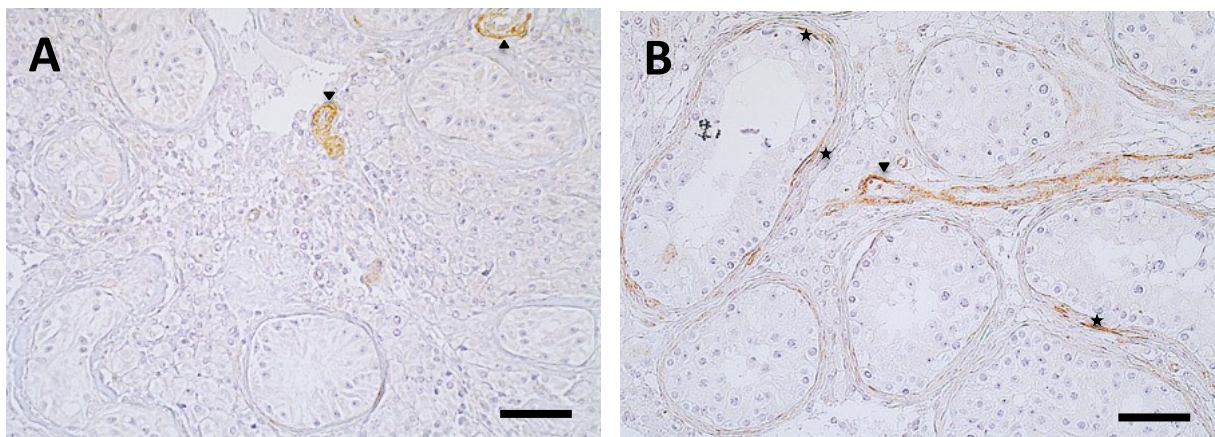
A und B (Vergrößerung von A) zeigen eine vorwiegend peritubuläre Expression (Sternchen, A und B) beim adulten Affen. Abbildung C zeigt einen infantilen Affen mit fehlender peritubulärer Expression von GPER und D einen juvenilen Affen mit beginnender peritubulärer Expression (Sternchen, D) sowie zunehmender Anfärbung interstitieller Zellen (Pfeile, C und D). Abbildung E zeigt GPER-positive, interstitielle Zellcluster (Pfeile, E) und die Anfärbung peritubulärer Zellen (Sternchen, E) beim präpubertären Affen. Als intrinsische Positivkontrolle sind die Wände der Arteriolen stets GPER-positiv (Pfeilspitzen, A-D). Alle Schnitte wurden mit Hämatoxylin gegengefärbt. Abbildung F ist eine Negativkontrolle des adulten Affen mit Normalserum. Skalierungsbalken ca. 50 µm.



Bei juvenilen Affen ( $n = 1$ ) zeigten sich einzelne peritubuläre (Sternchen, s. Abb. 14 D) und viele interstitielle Zellen (Pfeile, s. Abb. 14 D) GPER-positiv. An Gewebeproben peripubertärer Affen (3-4 Jahre alt;  $n = 2$ ) zeigten sich Cluster GPER-positiver, interstitieller Zellen (Pfeile, s. Abb. 14 E) sowie eine diskrete Zunahme der peritubulärer Zellanfärbung (Sternchen, s. Abb. 14 E). Die Glattmuskelzellen der Blutgefäße im Hoden waren unabhängig vom Alter des Affen stets GPER-positiv (Pfeilspitzen, s. Abb. 14 A-E) und dienen als intrinsische Positivkontrolle.

#### 4.4. GPER-Expression bei infertilen Männern

Es ist bekannt, dass sich der Phänotyp und die Funktion der peritubulären Zellen bei infertilen Männern verändert (6,75,76). Da die Expression von GPER in peritubulären Zellen erst beim adulten Affen auftrat und nicht beim noch zeugungsunfähigen Heranreifenden, stellte sich die Frage, ob die Expression von GPER durch die HTPCs in Zusammenhang mit der Fertilität steht. Zu diesem Zweck wurden Hodenbiospien von Patienten mit „Sertoli Cell Only“-Syndrom (SCO;  $n = 5$ ), „Germ Cell Arrest“-Syndrom (GA;  $n = 2$ ) und „Mixed Atrophy“-Syndrom (MA;  $n = 5$ ) untersucht.

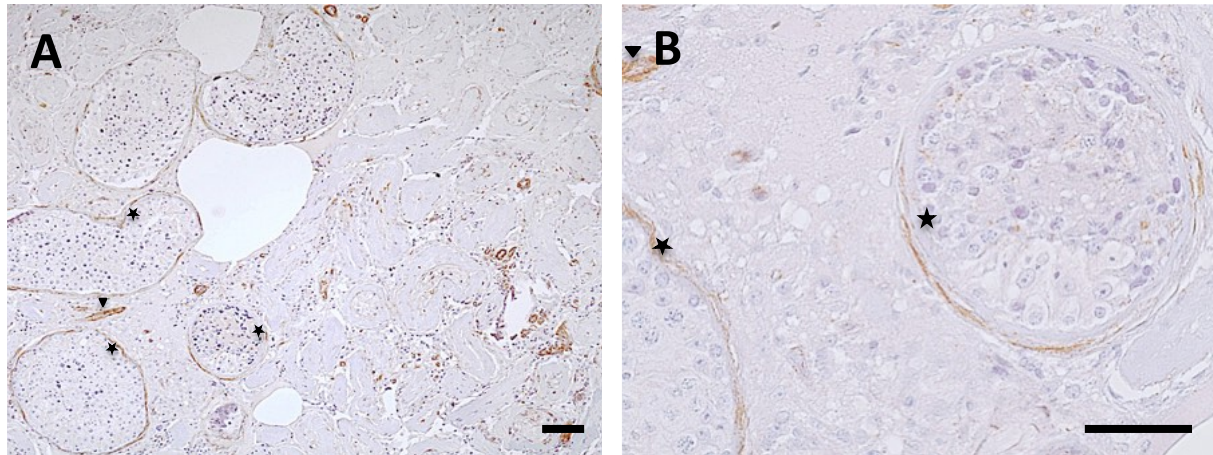


**Abb. 15 A-B: GPER-Expression bei Patienten mit SCO und GA.**

Patienten mit SCO (A) zeigen einen nahezu vollständigen Verlust peritubulär exprimierten GPERs, während bei Patienten mit GA (B) noch einige GPER-positve HTPCs vorhanden sind (Sternchen, B). Als intrinsische Positivkontrolle sind die Wände der Arteriolen stets GPER-positiv (Pfeilspitzen, A und B). Die Schnitte wurden mit Hämatoxylin gegengefärbt. Skalierungsbalken ca. 50  $\mu\text{m}$ .

Bei allen Patienten zeigte sich in den Tubuli mit beeinträchtigter Spermatogenese eine deutliche Reduktion bis hin zum völligen Verlust von GPER in peritubulären Zellen (s. Abb. 15 und 16; vgl. mit Normalbefund Abb. 9 A). In weniger degenerierten Tubuli blieb eine diskrete Expression von GPER erhalten (Sternchen, s. Abb. 15 B und Abb. 16 A und B).

Bei Patienten mit gemischter Atrophie (MA, s. Abb. 16 A und Vergrößerung Abb. 16 B) konnte die Reduktion von GPER besonders gut evaluiert werden. Bei dieser Erkrankung liegen funktionierende Tubuli mit normaler Spermatogenese und GPER-Expression der peritubulären Zellen (Sternchen, s. Abb. 16 A und B) direkt neben degenerierten Tubuli mit reduzierter GPER-Expression. Somit konnten methodisch bedingte Artefakte sicher ausgeschlossen werden.



**Abb. 16: GPER-Expression bei Patienten mit MA.**

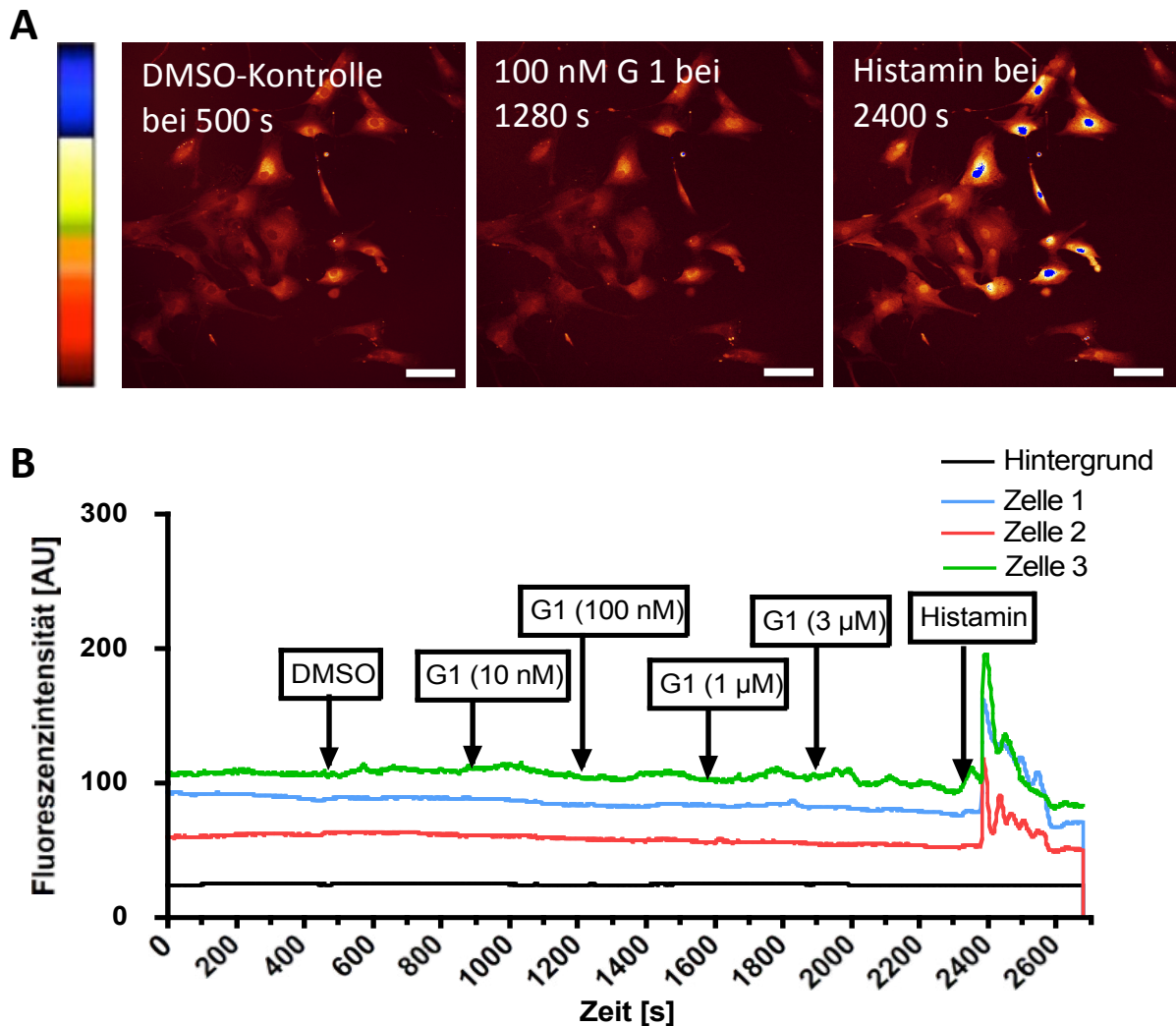
B ist die Vergrößerung von A. Morphologisch unauffällige Tubuli weisen die normale GPER-Expression in HTPCs auf (Sternchen, A und B), wohingegen in hyalinisierten Tubuli keine GPER-Expression mehr nachweisbar ist. Die Glattmuskelzellen der Blutgefäße sind GPER positiv (Pfeilspitzen, A und B). Die Schnitte wurden mit Hämatoxylin gegengefärbt. Skalierungsbalken ca. 50  $\mu\text{m}$ .

#### 4.5. GPER in HTPCs: Funktionelle Untersuchungen mit G 1 und G 15

Um die Funktionalität von GPER zu untersuchen wurden kultivierte HTPCs verwendet. Es wurden Untersuchungen zum Signalweg ( $\text{Ca}^{2+}$ -Messungen) und zur Proliferation (DAPI-Färbungen, CASY und „live cell“-Beobachtungen) von HTPCs durchgeführt. Zur Stimulation wurden G 1, G 15 und Östradiol eingesetzt. G 1 gilt bis zu einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  als spezifischer, artifizieller Agonist am GPER (47,63,71). G 15 ist ein spezifischer Antagonist am GPER (47,63,72). Östradiol ( $\text{E}_2$ ) ist ein natürlich im Körper vorkommendes, potentes Östrogen (40).

#### 4.5.1. $\text{Ca}^{2+}$ -Messungen

Einigen Studien zufolge kann G 1 über GPER schnelle Signalwege induzieren, die unter anderem zu einer transienten Erhöhung des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegels führen (54,67).



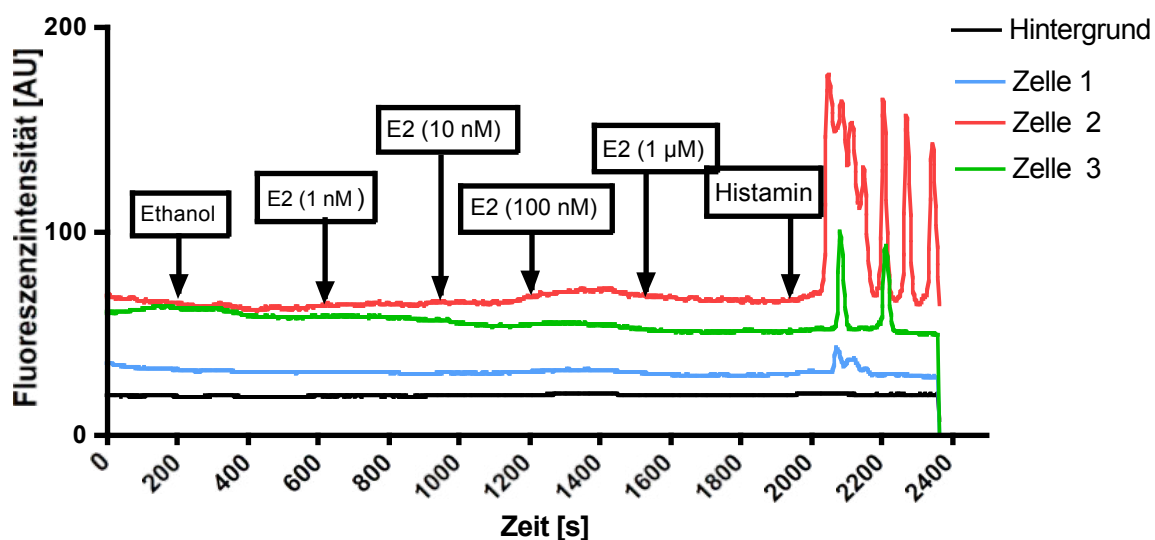
**Abb. 17:  $\text{Ca}^{2+}$ -Messungen an HTPCs nach G 1-Stimulation.**

Abbildung A zeigt mit Fluo-4 AM versetzte HTPCs unter verschiedenen Bedingungen: nach Zugabe von DMSO (Kontrolle), G 1 (100 nM G 1) und Histamin (ganz rechts). Der Farbbalken (ganz links) spiegelt die Intensität des Signals wieder. Skalierungsbalken ca. 20  $\mu\text{m}$ . Abbildung B zeigt drei exemplarische HTPCs (Zelle 1-3; blau, rot und grün) und die Reaktion auf die Zugabe von DMSO und G 1 in 10 nM, 100 nM, 1  $\mu\text{M}$  und 3  $\mu\text{M}$  (Pfeile). Nach Zugabe von Histamin (Positivkontrolle) zeigt sich eine deutliche Reaktion der Zellen. Die basale Linie (schwarz) beweist einen störungsfreien Hintergrund.

Diesen Calciumanstieg kann man mit Hilfe des fluoreszierenden Farbstoffs Fluo-4 sichtbar machen. Die Reaktion der HTPCs auf die Zugabe von G 1 wurde im folgenden Experiment untersucht. Da G 1 in DMSO gelöst wird, wurden die Zellen zur Kontrolle mit DMSO (0,01 %) stimuliert. In den durchgeführten Versuchen blieb der erwartete  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg nach Zugabe

von G 1 aus (s. Abb. 17). Um methodische Probleme auszuschließen und die Vitalität bzw. Funktionalität der Zellen zu überprüfen, wurde im selben Versuchsaufbau Histamin als Positivkontrolle zugegeben (77).

Da G 1 physiologisch nicht im menschlichen Körper vorkommt, wurden die Versuche auch mit Östradiol ( $E_2$ ) durchgeführt.  $E_2$  wirkt allerdings nicht nur über GPER, sondern auch bzw. vor allem über ESR 1 und ESR 2. Da Östradiol in Ethanol gelöst wird, wurde zur Kontrolle Ethanol in entsprechender Konzentration verwendet. Beide Substanzen lösten keinen nachweisbaren Calciumanstieg aus. Die Positivkontrolle mit Histamin (77) löste in beiden Versuchen einen intrazellulären Calciumanstieg aus und bestätigte so die Vitalität und Funktionalität der Zellen (s. Abb. 17 und Abb. 18). Der Hintergrund blieb stets signalfrei.



**Abb. 18:  $Ca^{2+}$ -Messungen an HTPCs nach  $E_2$ -Stimulation.**

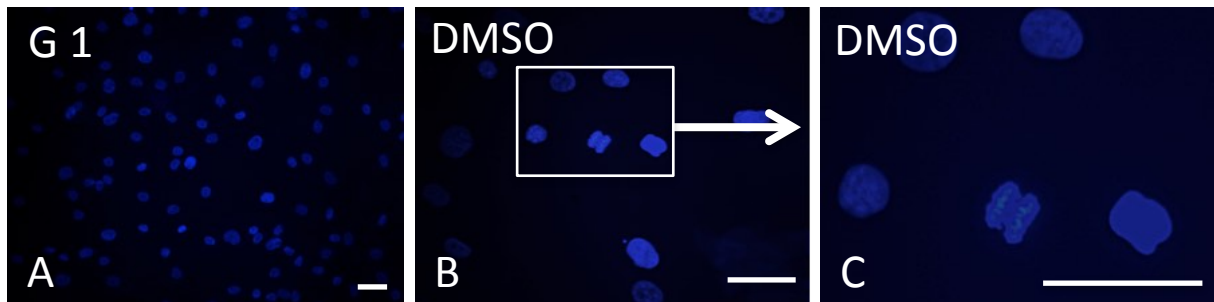
Abbildung C zeigt drei exemplarische HTPCs (Zelle 1-3; Blau, rot und grün) und ihre Reaktion auf die durch Pfeile gekennzeichnete Zugabe von Ethanol (Kontrolle) und  $E_2$  in 1 nM, 10 nM, 100 nM und 1  $\mu$ M. Nach Zugabe von Histamin (Positivkontrolle) zeigt sich eine deutliche Reaktion der Zellen. Die basale Linie (schwarz) beweist einen störungsfreien Hintergrund.

#### 4.5.2. DAPI-Kernfärbungen

Um zu untersuchen, ob und wie kultivierte HTPCs auf die Stimulation von GPER reagieren, wurden Mitosestadien unter dem Mikroskop beurteilt. Dazu wurden HTPCs dreier Individuen ( $n = 3$ ) auf Deckgläschen ausgesät, über einen Zeitraum von 24 h mit G 1 stimuliert und anschließend fixiert und mit DAPI eingefärbt. Die Kontrolle wurde mit DMSO anstelle von G 1 durchgeführt.



Nach 24 h Behandlung mit DMSO befanden sich die untersuchten HTPCs in verschiedenen Mitosephasen (z. B. Telophase, s. Abb. 19 B und Vergrößerung Abb. 19 C). Nach Stimulation mit G 1 konnten nahezu keine Mitosefiguren gefunden werden (s. Abb. 19 A). G 1 könnte somit die Mitose der HTPCs hemmen, also antiproliferativ wirken.

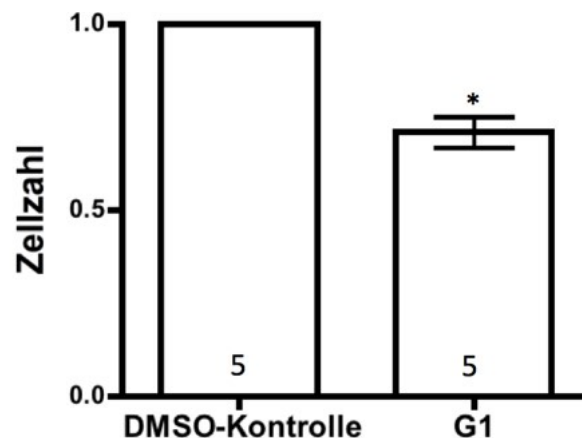


**Abb. 19: DAPI-Fluoreszenzfärbung der Zellkerne von HTPCs.**

HTPCs ( $n = 3$ ), die 24 h mit G 1 (A) oder DMSO zur Kontrolle (B und Vergrößerung C) behandelt wurden. Die G 1-behandelten HTPCs zeigen keine Mitosefiguren. In DMSO-behandelten Kontrollen hingegen sind verschiedene Mitosefiguren vorhanden (z. B. Telophase, 19 C). Skalierungsbalken ca. 25  $\mu\text{m}$ .

#### 4.5.3. Versuche mit CASY

Da die Darstellung der Mitosefiguren keine quantitative Aussage über die Proliferationsrate zulässt, wurden die kultivierten HTPCs im nächsten Experiment nach 24-stündiger G 1-Stimulation mit Hilfe von CASY (automatisiertes Zellzählsystem) ausgezählt.



**Abb. 20: Zellzahlbestimmung mit CASY.**

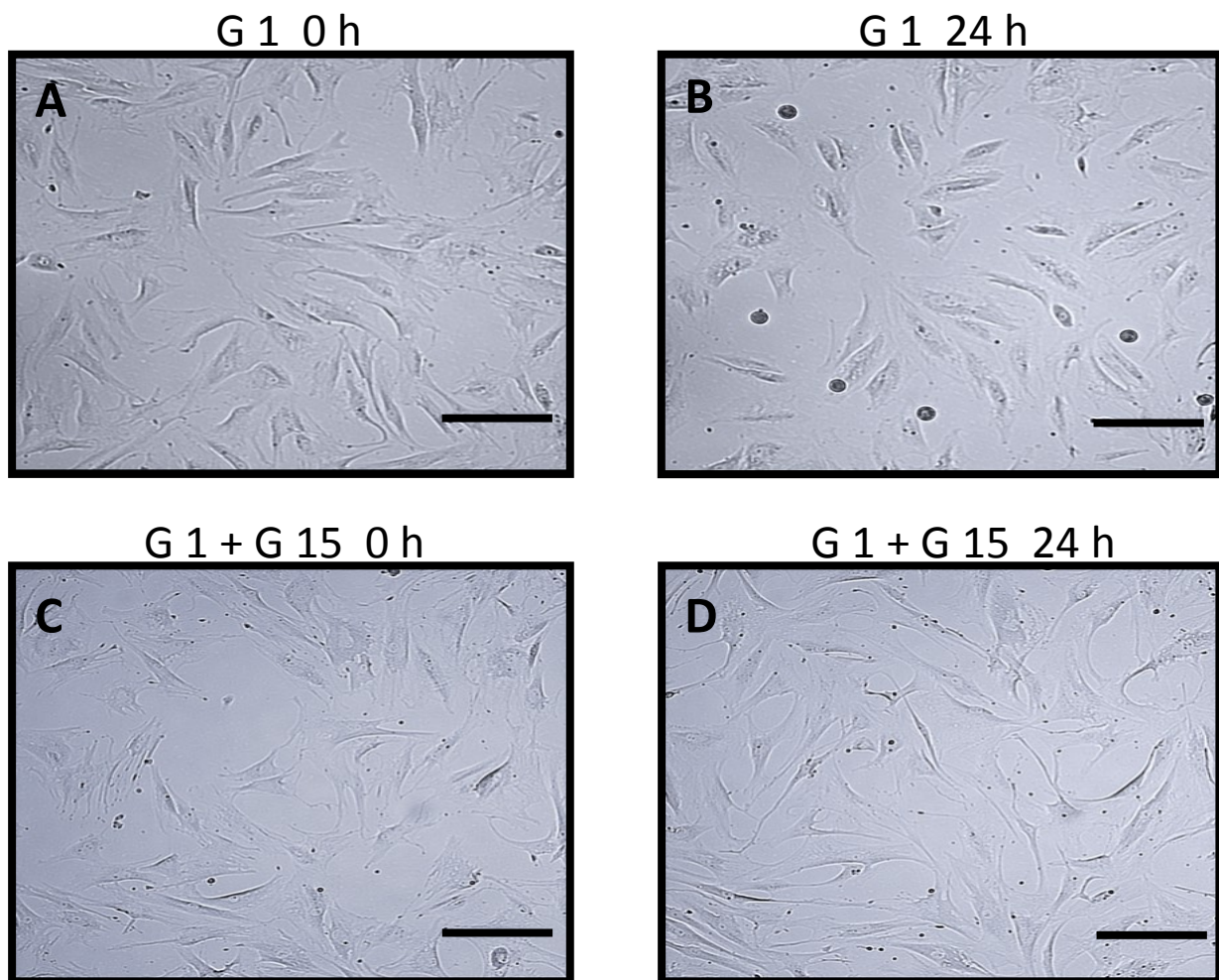
Die Graphik zeigt die normierte Zusammenfassung der Zellzahlbestimmungen mit CASY von fünf einzelnen Experimenten ( $n = 5$ ). Zellkulturen, die für 24 h mit G 1 anstelle von DMSO (Kontrolle) stimuliert wurden, weisen eine signifikante (\*) Reduktion der Zellzahl auf (rechter Balken).

Als Kontrolle diente die Stimulation mit dem G 1-Lösungsmittel DMSO (0,01 %). Zellkulturen, die zur Kontrolle nur mit DMSO behandelt wurden zeigten ein natürliches Zellwachstum mit

normaler Zellproliferation (s. Abb. 20). Die Stimulation mit G 1 reduzierte diese Zellvermehrung signifikant („Student’s t-test“). Das Experiment wurde fünfmal unabhängig voneinander durchgeführt.

#### 4.5.4. „Live Cell“- Beobachtungen

Um die Folgen einer Stimulation der HTPCs mit G 1 genauer zu untersuchen, wurden die Zellen für 24 h unter dem Mikroskop beobachtet.



**Abb. 21: „Time-Lapse“-Bilderfolge von HTPCs nach Stimulation mit G 1 und G 15.**

Die Abbildungen A-D zeigen einen Ausschnitt aus einer Kultur von HTPCs direkt nach Zugabe von G 1 (A) und denselben Ausschnitt 24 h später (B) mit verringerter Zellzahl sowie rundlichen, abgelösten Zellen. Für Abb. C und D wurden die Kulturschalen 30 min lang mit G 15 vorstimuliert. C zeigt einen Ausschnitt der HTPC-Kultur direkt nach Zugabe von G 1, D zeigt denselben Ausschnitt 24 h später mit unauffälliger Zellproliferation und Morphologie. Skalierungsbalken ca. 25  $\mu\text{m}$ .

Dazu wurden ausgewählte Bildausschnitte drei verschiedener HTPC-Zellkulturen ( $n = 3$ ) alle 10 min fotografiert und anschließend ein „Time-Lapse“-Video erstellt. Wie aus Vorversuchen bekannt, proliferieren HTPCs normalerweise langsam durch mitotische Zellteilungen.

Nach Zugabe von G 1 zeigte sich allerdings ein anderes Bild: Die Zellen proliferierten nicht mehr und sie veränderten ihre Morphologie. Abb. 21 A zeigt einen Bildausschnitt der HTPC-Kulturschale unmittelbar nach Zugabe von G 1 (Zeitpunkt 0). Abb. 21 B zeigt denselben Bildausschnitt nach 24 h (unter den üblichen Kulturbedingungen). Die Zellen wurden zunehmend rund und lösten sich teilweise vom Boden der Kulturschale (vgl. Abb. 21 A und 21 B). Möglicherweise fand sogar Zelltod statt.

Dieser antiproliferative Effekt ließ sich durch 30-minütige Vorstimulation mit dem GPER-spezifischen Antagonisten G 15 komplett unterdrücken (vgl. Abb. 21 C und D). Die mit G 15 vorbehandelten Zellen zeigten neben dem normalen Zellwachstum auch eine unauffällige Morphologie (s. Abb. 21 D).

## 5. Diskussion

Primäres Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das Vorkommen von GPER im Hoden zu untersuchen. Darüber hinaus wurden Untersuchungen zur Funktion von GPER durchgeführt. Dazu wurden immunhistochemische Analysen von Hodengewebeschnitten verschiedener Spezies sowie funktionelle Untersuchungen an kultivierten HTPCs durchgeführt.

Zum ersten Mal konnte gezeigt werden, dass GPER von den peritubulären Zellen der Samenkanälchen Spezies-unabhängig (Maus, Ratte, Affe, Mensch) beim Adulten exprimiert wird. Außerdem weisen die Ergebnisse darauf hin, dass diese Expression in Zusammenhang mit der Funktion des Hodens und der männlichen Fertilität steht.

### 5.1. GPER-Lokalisation im Primatenhoden

Die Studien der letzten Jahre zeigen, dass die glatten Muskelzellen der Gefäße eine starke GPER-Expression aufweisen (51,55,57,63). Dies ist konsistent mit den Beobachtungen der vorliegenden immunhistochemischen Analyse von testikulären Gewebeproben verschiedener Spezies (Maus, Ratte, Affe, Mensch). Die GPER-Expression durch Gefäßmuskelzellen der interstitiellen Hodengefäße war unabhängig von Spezies, Alter oder Fertilitätsgrad durchgehend gleichmäßig stark zu beobachten und diente als intrinsische Kontrolle für den Färbungserfolg.

In der vorliegenden Studie waren zusätzlich vereinzelte, interstitiell gelegene Zellen im Hoden GPER-positiv. Die Anzahl der interstitiellen, GPER-positiven Zellen variierte vor allem während der Reifung des Hodens. Beim adulten Menschen und beim adulten Affen fanden sich lediglich vereinzelt GPER-positive Zellen im Interstitium. In der Pubertät hingegen zeigten sich deutlich erkennbare Zellcluster von GPER-positiven interstitiellen Hodenzellen. Beim infantilen Hoden exprimierten die interstitiellen Zellen wenig bis kein GPER. Aufgrund des Verteilungsmusters lag die Vermutung nahe, dass es sich hierbei um testikuläre Mastzellen handeln könnte. Das Vorkommen von Mastzellen im Interstitium des humanen Hodens wurde bereits beschrieben (18,31). Eine Doppelfärbung mit Mastzelltryptase und GPER an humanen Hodengewebebeobachtungen zeigte jedoch, dass lediglich ein geringer Teil der interstitiellen, GPER-positiven Zellen tatsächlich den testikulären Mastzellen entspricht. Die Mehrheit der GPER-positiven, interstitiellen Zellen exprimierte allerdings keine Mastzelltryptase.

Möglicherweise handelt es sich bei dem Großteil der GPER-positiven, interstitiellen Zellen um Leydig-Zellen. Die Expression von GPER in interstitiell gelegenen Leydig-Zellen des Ho-



dens wurde bereits in mehreren Studien gezeigt (66,69). Es bedarf jedoch weiterer Studien um zu klären, ob es sich bei den GPER-positiven interstitiellen Zellen um Leydig-Zellen oder andere, noch zu identifizierende Zelltypen handelt.

In der Literatur finden sich widersprüchliche Angaben bezüglich der zellulären Lokalisation von GPER in den Hodenkanälchen. Rago et al. und Chevalier et al. bewiesen das Vorkommen von GPER in humanen Sertoli-Zellen (66,69). Dies konnte in der vorliegenden Arbeit weder beim Primaten noch beim Nager bestätigt werden. Chevalier et al. (66) fanden außerdem, im Gegensatz zu al Rago et al. (69), einen Hinweis auf das Vorkommen von GPER in den Keimzellen des Hodens. In der vorliegenden immunhistochemischen Analyse waren Sertoli-Zellen wie auch Keimzellen in allen getesteten Spezies (Maus, Affe, Mensch) weitgehend GPER-negativ. Für die Experimente dieser Arbeit wurde ein Rezeptor-Antikörper verwendet, der den extrazellulären N-Terminus des humanen G Protein-gekoppelten Rezeptors erkennt. Mit diesem Rezeptor-Antikörper wurden zwei unterschiedliche methodische Ansätze der Immundetektion verfolgt. In der ABC/DAB-Methode blieb das Keimepithel stets ungefärbt, lediglich in der Fluoreszenz-Doppelfärbung humaner Hodenschnitte zeigte sich das Keimepithel schwach positiv für GPER (s. Abb. 11 B). Alle weiteren Ergebnisse der ABC/DAB-Methode und der Immunfluoreszenzuntersuchungen stimmten überein. Die verwendeten Methoden unterscheiden sich vor allem durch unterschiedliche Zweitantikörper. Die Keimzellfärbung in der Immunfluoreszenzuntersuchung ist daher beispielsweise durch eine unspezifische Reaktion des Fluoreszenz-markierten Zweitantikörpers zu erklären. Eine Keimzelllokalisierung von GPER muss aber in Betracht gezogen werden.

Bei immunhistochemischen Färbungen an testikulärem Rattengewebe ergaben sich Hinweise auf eine Expression von GPER in den lumennah gelegenen Spermatozyten (s. Abb. 9 G). Dabei könnte es sich um eine unspezifische Färbung handeln, da die Spezifität des verwendeten Antikörpers ( $\alpha$ -human GPER) nur an humanen Zellen (HTPCs), nicht aber an Rattengewebe in Western Blot-Experimenten erhärtet wurde (singuläre Bande bei 42 kDa; s. Abb. 13 B; (68)).

Die in den bisherigen Publikationen beschriebenen Unterschiede der zellulären Zuordnung von GPER im Hodengewebe sind auffällig. Möglicherweise stehen sie in Zusammenhang mit der Verwendung verschiedener primärer GPER-Antikörper und einer unterschiedlichen Sensitivität oder Spezifität. Auch die Liganden-Bindungsstelle am transmembranösen GPER außerhalb oder innerhalb der Zellmembran beziehungsweise der Membran-umschließenden

Organelle spielt eine Rolle. Dabei können Fixation und Aufbereitung des Gewebes das Ergebnis von immunhistochemischen Untersuchungen beeinflussen. Um dieses Problem zu umgehen, müssten Studien mit standardisiert-fixiertem Hodengewebe, mehreren Antikörpern und verschiedenen Färbemethoden durchgeführt werden.

Überraschend und bisher nicht beschrieben war das Hauptergebnis dieser Untersuchung: GPER kommt bei allen getesteten adulten Spezies (Maus, Ratte, Affe, Mensch) in den peritubulären Zellen der Samenkanälchen vor. Die Expression von GPER durch die peritubulären Zellen konnte in jedem durchgeführten Färbeversuch, also unabhängig vom Zweitantikörper sowohl bei der ABC/DAB-Methode wie bei der Immunfluoreszenzmethode nachgewiesen werden. Zudem konnte das Vorkommen von GPER in den peritubulären Zellen anhand einer etablierten Kultur von HTPCs (15,34,77) im Western Blot sowie durch RT-PCR und Sequenzierung bestätigt werden.

## 5.2. Intrazelluläre Lokalisation von GPER

Die intrazelluläre Lokalisation von GPER wurde in einer Studie von Revankar et al. 2005 an transifizierten Fibroblasten aus Affennieren (COS 7) untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass GPER vorwiegend zytoplasmatisch im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert ist (54,71). Im Gegensatz dazu zeigten Chakrabati et al. an kultivierten humanen Epithelzellen der Umbilikalvene (HUVECs), dass GPER im Zellkern lokalisiert ist (63). Im selben Jahr erschien eine weitere Studie von Chevalier et al. zur Lokalisation von GPER an einer humanen Seminomzelllinie, die eine zytoplasmatische wie auch eine membranständige Expression von GPER fand (66). Aufgrund der diversen Studienergebnisse wäre es also denkbar, dass die zelluläre Lokalisation von GPER grundsätzlich variabel ist.

GPER gehört zur Gruppe der G Protein-gekoppelten Rezeptoren und besitzt eine transmembranöse, heptahelicale Verankerung in einer Membran (54,78). Dabei kann es sich um die Zellmembran oder aber die Membran von Zellorganellen handeln. Da Östradiol als der physiologische Ligand am GPER Zellmembranen durchdringen kann, erscheint eine intrazelluläre Lokalisation plausibel und könnte in Zusammenhang mit spezifischen Funktionen des GPER stehen. In der vorliegenden Studie wurde an optimal fixiertem Hodengewebe des Affen beobachtet, dass GPER in den interstitiellen und peritubulären Zellen vorwiegend zytoplasmatisch vorliegt (s. Abb. 10 A und 10 B). Die Lokalisation von GPER konnte weder dem Zellkern noch der Zellmembran zugeordnet werden. Eine endgültige Beurteilung der zellulä-

ren Lokalisation von GPER in peritubulären Zellen kann aufgrund der bisherigen Untersuchungen an Paraffinmaterial jedoch nicht getroffen werden.

### 5.3. Aktivierung von GPER in HTPCs

Die Bindung von Östradiol an die klassischen Östrogenrezeptoren ESR 1 und ESR 2 bewirkt eine Translokation derselben in den Zellkern, wo sie die Funktion von Transkriptionsfaktoren übernehmen. Nach Stimulation mit Östradiol beobachtete man in der Zelle neben den Reaktionen auf genomischer Ebene zudem die schnelle Generierung von „Second Messengern“ wie  $\text{Ca}^{2+}$  und Stickstoffmonoxid (52,79,80). Zelluläre Konsequenzen der Aktivierung solcher „Second Messenger“ beinhalten unter anderem Adhäsion, Migration und Proliferation (54). Extrazellulär-signalregulierte Kinasen (ERKs) werden von extrazellulären Signalmolekülen, unter anderem über G Protein-gekoppelte Rezeptoren aktiviert und sind dann für die intrazelluläre Signaltransduktion zuständig. So werden Vorgänge wie Proliferation oder Differenzierung in der Zelle gesteuert (81,82). Seit eine Korrelationen zwischen der Expression von GPER und der Östrogen-vermittelten Aktivierung von ERKs bekannt ist (61,80), nimmt man an, dass GPER als Membran-gebundener Rezeptor schnelle, nicht-genomische Östrogeneffekte vermittelt (54,56,57).

Revankar et al. belegten 2005 die Mobilisierung von  $\text{Ca}^{2+}$  durch Stimulation mit  $17\beta$ -Östradiol an GPER-transfizierten Nierenzellen des Affen (54). In der vorliegenden Studie ergaben die an HTPCs durchgeführten  $\text{Ca}^{2+}$ -Messungen mit der verwendeten Methode und Fluo-4 als Indikator nach Stimulation mit dem spezifischen GPER-Agonisten G 1 oder Östradiol keinen messbaren intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg, obwohl die mit Histamin durchgeführte Positivkontrolle (77) stets eine Reaktion auslöste. Aufgrund des negativen Befundes wäre es denkbar, dass der in den HTPCs vorkommende GPER nicht funktionell ist. Die nachfolgenden Experimente zur Inhibition der Zellproliferation sprechen allerdings für funktionelle GPERs in HTPCs. Wurden die HTPC-Zellkulturen mit dem GPER-Agonisten G 1 stimuliert, zeigte sich eine Abnahme der Proliferationsrate von HTPCs. Durch die zusätzliche Gabe des Antagonisten G 15 konnte dieser Effekt gehemmt werden und es resultierte eine normale Zellproliferationsrate. Die Diversität im „Signaling“ könnte auch Folge der unterschiedlichen Lokalisation des Rezeptors in der Zelle sein. Da die vorliegende Studie als erste ihrer Art die Expression von GPER an humanen, peritubulären Hodenzellen getestet hat, kann hierzu bislang keine abschließende Aussage getroffen werden.

#### 5.4. GPER-vermittelte antiproliferative Wirkung auf HTPCs

Der zuvor nicht beschriebene, immunhistochemische Nachweis von GPER in adulten humanen peritubulären Hodenzellen war Anlass für weitere Untersuchungen an HTPCs.

Funktionelle Untersuchungen mit dem spezifischen Agonisten G 1 ergaben, dass die Aktivierung von GPER zu einer reduzierten Proliferationsrate der HTPCs führt. Dieser Effekt konnte durch die Zugabe von G 15, einem spezifischen Antagonisten am GPER vollständig unterdrückt werden. Chimento (68) beschrieb eine über GPER-vermittelte antiproliferative Wirkung in Leydig-Tumorzellen der Ratte, Allerdings nur in pathologisch veränderten Tumorzellen, die anders als normale Leydig-Zellen außer GPER auch ESR 1 und ESR 2 exprimieren (68). Auch in hormonsensitiven Brustkrebszellen (67) und in Ovarialkrebszellen (83) hatte die Aktivierung von GPER mit G 1 einen antiproliferativen Effekt. Im Gegensatz dazu ergab die Aktivierung von GPER in einer humanen Seminom-Zelllinie einen proliferativen Effekt auf die Zellen (66). Aufgrund der unterschiedlichen Ergebnisse verschiedener Studien kann man davon ausgehen, dass die GPER-induzierte Wirkung auf die Zelle zelltypspezifisch variabel ist und/oder von der Koexpression anderer Östrogenrezeptoren abhängt.

Die in der HTPC-Zellkultur beobachtete GPER-vermittelte antiproliferative Wirkung auf das Zellwachstum könnte von pathophysiologischer Bedeutung sein. Die Tatsache, dass sich Tubuluswände bei Infertilität verdicken (6,15,18), könnte darauf hindeuten, dass HTPCs vermehrt proliferieren. Dies könnte in Zusammenhang mit einer Reduktion der GPER-vermittelten antiproliferativen Wirkung stehen.

Beim Affen zeigte sich mit Eintritt der Pubertät eine signifikante Zunahme der GPER-Expression durch peritubuläre Zellen. Zeitgleich sind die Tubuli ausgewachsen und ihre Zellproliferation wird durch einen bisher unbekannten Mechanismus gebremst. Ein Zusammenhang wäre hier durchaus denkbar, muss aber in weiteren Studien erst erforscht werden. Der Verdacht einer GPER-vermittelten antiproliferativen Wirkung wird durch die phänotypische Ähnlichkeit zwischen Glattmuskelzellen von Gefäßwänden und peritubulären glattmuskelähnlichen Zellen weiter erhärtet. In Studien an Glattmuskelzellen von Arterienwänden konnte eine GPER-vermittelte Inhibition der Proliferation bereits gezeigt werden (57,84).

### 5.5. Zusammenhang zwischen der GPER-Expression im Hoden und Fertilität

Östrogenrezeptoren spielen im Hoden eine wesentliche Rolle für die Entwicklung bzw. für die Aufrechterhaltung der männlichen Fertilität (85). In der vorliegenden Untersuchung konnte gezeigt werden, dass die peritubuläre GPER-Expression bei infertilen Männern deutlich reduziert ist oder sogar komplett verschwindet. Untersuchungen zur Expression von GPER während der Entwicklung und Reifung des Hodens festigten den Zusammenhang zwischen der peritubulären Expression von GPER und der Fertilität. Für die Untersuchungen am unreifen Hoden wurden Gewebeproben vom Affen verwendet. Das Hodengewebe des Affen ist dem menschlichen Hodengewebe anatomisch und physiologisch sehr ähnlich. Es konnte gezeigt werden, dass GPER beim Rhesusaffen erst ab der Pubertät von den peritubulären Zellen exprimiert wird. Zuvor findet keine GPER-Expression im Bereich der Tubuluswände statt.

Die Expression in Glattmuskelzellen der Gefäße (51,63) blieb auch bei reduzierter GPER-Expression durch die peritubulären Zellen unverändert. Technische Probleme konnten so ausgeschlossen werden.

Der Beginn der GPER-Expression in peritubulären Zellen mit Eintritt in die Pubertät (beim Affen) und der Verlust der Expression bei Infertilität (des erwachsenen Mannes) lässt vermuten, dass GPER an der Ausbildung und dem Erhalt der männlichen Fertilität maßgeblich beteiligt ist. HTPCs bilden eine Vielzahl von Faktoren (z. B. GDNF) und beeinflussen so die Spermatogenese (8). Möglicherweise wird die Funktion der peritubulären Zellen mitunter über GPER gesteuert.

Versuche mit GPER-„Knockout“-Mäusen zeigten, dass das Vorhandensein von GPER für die Fertilität nicht notwendig ist. Auch die bei ESR 1- und ESR 2-„Knockout“-Mäusen auftretenden morphologischen Veränderungen des Reproduktionstraktes, blieben bei Versuchen mit GPER-„Knockout“ Mäusen aus (47,86). GPER scheint also nicht für die Entstehung der Infertilität bei der Maus verantwortlich zu sein, sondern könnte als Folge der Infertilität reduziert sein. Somit könnte GPER gegebenenfalls als Prädiktor für das Maß der Fertilität/Infertilität herangezogen werden. Ebenfalls denkbar wären speziesspezifisch unterschiedliche Folgen des GPER-„Knockouts“. In Studien zum Expressionsverhalten von ESR 1 wurden bereits speziesspezifische Unterschiede gefunden (10,46). Solche Unterschiede wären auch für GPER denkbar. Leider gibt es außer der Studie an Mäusen bisher keine Daten über GPER-„Knockout“-Versuche.

## 6. Zusammenfassung

Im menschlichen Hoden wurden bisher drei funktionell relevante Östrogenrezeptoren identifiziert: Die zwei klassischen, kernständigen Östrogenrezeptoren ESR 1 und ESR 2 und der membranständige, G Protein-gekoppelte Rezeptor GPER. Während die beiden klassischen Östrogenrezeptoren bereits im Fokus zahlreicher Studien standen, gibt es bisher nur wenig Information über Funktion und Vorkommen von testikulärem GPER und dessen Funktion. In der vorliegenden Arbeit wurde eine immunhistochemische Analyse der testikulären Expression von GPER an verschiedenen Nager- und Primatenspezies durchgeführt. Sie zeigt erstmals, dass GPER speziesunabhängig im Hoden nicht nur in interstitiellen Zellen und Zellen von Gefäßwänden, sondern auch in peritubulären glattmuskelähnlichen Zellen der Samenkanälchen vorhanden ist. Diese peritubuläre Expression von GPER konnte im Western Blot sowie in der RT-PCR/Sequenzierung an isolierten Zellen bestätigt werden.

Anhand einer etablierten Zellkultur von humanen testikulären peritubulären Zellen (HTPCs) konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Stimulation von GPER mit dem Rezeptorspezifischen Agonisten G 1 zu einer signifikanten Reduktion der Anzahl von HTPCs führt. G 15, ein spezifischer Antagonist am GPER, blockierte die G 1-vermittelte Wirkung vollständig. GPER scheint an der Regulation von Proliferation und möglicherweise Apoptose in den testikulären peritubulären Zellen beteiligt zu sein.

Peritubuläre Hodenzellen ändern während der Entwicklung und bei der Entstehung von Infertilität sowohl ihren Phänotyp als auch ihre Funktion. In der vorliegenden Arbeit wurden Hodenproben vom Rhesusaffen in verschiedenen Entwicklungsstufen hinsichtlich der Expression von GPER untersucht. GPER konnte in den testikulären, peritubulären Zellen der Rhesusaffen erst ab der Pubertät nachgewiesen werden. Bei unreifen, präpubertären Affen waren lediglich interstitielle Zellen und Zellen der Gefäßwände GPER-positiv, nicht jedoch die peritubulären Zellen. Interessanterweise wiesen die HTPCs von infertilen Männern ebenfalls eine deutliche Reduktion der peritubulären GPER-Expression auf. Anhand der Gewebeproben von Patienten mit gemischter Atrophie, Keimzellarrest- und „Sertoli Cell Only“-Syndrom konnte dies untersucht werden: Die Wände von Hodenkanälchen mit gestörter Spermatogenese wiesen einen Verlust von GPER auf. Dabei korrelierte der degenerative Umbau mit dem Ausmaß des Verlustes von GPER. In vollständig fibrosierten Tubuluswänden ließ sich in den HTPCs überhaupt kein GPER mehr nachweisen.

Es ist also denkbar, dass Östrogen-vermittelte antiproliferative Effekte auf die testikulären peritubulären Zellen durch GPER vermittelt werden, und dass diese Effekte mit der Fertilität des Mannes zusammenhängen. Weitere mögliche Funktionen des GPER in humanen testikulären, peritubulären Zellen sind wahrscheinlich und sollten im Mittelpunkt zukünftiger Untersuchungen stehen.

## 7. Anhang

### 7.1. Geräte

**Tab. 3: Auflistung der verwendeten Geräte.**

Gerät	Hersteller	Ort
Absaugpumpe	Chromaphor	Duisburg, Deutschland
Agarosegelelektrophoresekammer	Biorad	München, Deutschland
Anwaage XS 205	Mettler Toledo	Giessen, Deutschland
BioPhotometer	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Brutschränke BBD 6220	Heraeus	Osterode, Deutschland
Bunsenbrenner Fireboy plus	Integra Biosciences	Wallisellen, Schweiz
CASY	Schärfe System	Reutlingen, Deutschland
Chemi Smart 5000	Peqlab	Erlangen, Deutschland
Count-Down Timer	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Duomax Schüttler 1030	Heidolph Instruments	Schwabach, Deutschland
Einkanalpipetten	Gilson	Middleton, WI, USA
Feinwaage	Sartorius	Göttingen, Deutschland
Fluoreszenzlampe HBO 100 W	Zeiss	München, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop Axioplan	Zeiss	München, Deutschland
Fluostar Optima	BGM Labtech	Offenburg, Deutschland
Gefriertruhe -80°C	Sanyo	Bad Nenndorf, Deutschland
HandyStep	Brand	Wertheim, Deutschland
Heating System	Ibidi	Martinsried, Deutschland
IKA-Magnetrührer RCT	IKA-Werk	Staufen, Deutschland
IKA-Schüttler MTS4	IKA-Werk	Staufen, Deutschland
Kamera ProgRes CT3 (Axiovert 135)	Jenoptik	Jena, Deutschland
Konfokales Mikroskop mit Laser und Scanner	Leica	Wetzlar, Deutschland
Kamera Fluoreszenzmikroskop	Visitron Systems	Puchheim, Deutschland
Kühl- und Gefrierschränke -20° C, 4° C	Liebherr	Kirchdorf, Deutschland
Kühlzentrifuge Biofuge Fresco	Heraeus	Osterode, Deutschland
Mehrkanalpipette	Rainin	Giessen, Deutschland
Microplate Reader	Dynex	Chantilly, USA
Mikroskop Axiovert 135	Zeiss	München, Deutschland
Mikrotom Leica SM2000R	Leica	Wetzlar, Deutschland
Mikrowelle M690	Miele	Gütersloh, Deutschland
Mikrowellentopf	Nordic Ware	Mineapolis, USA
Mikrozentrifuge	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Mini Trans-Blot® Cell	Biorad	München, Deutschland
Mr Frosty	Thermo Scientific	Waltham, MA, USA
Mikroskop Diaphot	Nikon	Düsseldorf, Germany
pH Meter 320	Mettler Toledo	Giessen, Deutschland
Power Pac 300	Biorad	München, Deutschland
Pumpe	Chromaphor	Oberhausen, Deutschland
SDS-PAGE Protean 3	Biorad	München, Deutschland
Sterilbank	Holten LaminAir	Allerød, Dänemark
Stripettor	Thermo Scientific	Waltham, MA, USA
The Brick	Life Imaging Services	Basel, Schweiz
Thermocycler PTC 200	Biorad	München, Deutschland
Tischzentrifuge	Neolab	Heidelberg, Deutschland
Ultraschallprozessor 50 H	Dr. Hielscher	Teltow, Deutschland
Vortex-Genie 2	Neolab	Heidelberg, Deutschland
Zentrifuge Labofuge 400	Heraeus	Osterode, Deutschland



## 7.2. Verbrauchsmaterialien

**Tab. 4: Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien.**

Verbrauchsmaterial	Hersteller	Ort
24-Well-Platte	Thermo Scientific	Waltham, USA
96-Well-Platte	Thermo Scientific	Waltham, USA
CryoPure Gefäß	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Deckgläser	Menzel	Braunschweig, Deutschland
Eppendorfgefäße	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Falcon- Röhrchen	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
35 mm Schälchen	Ibidi	Martinsried, Deutschland
Kulturschalen 60mm	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Kulturflaschen	Thermo Scientific	Waltham, USA
Latexhandschuhe	Kimberly-Clark	Dallas, USA
Multistep Pipettenspitzen	Brand	Wertheim, Deutschland
Nitrilhandschuhe	Ansell	Brüssel, Belgien
Nitrocellulosemembran	Macherey-Nagel	Düren, Deutschland
Objetträger	Thermo Scientific	Waltham, USA
PAP-Pen	Kisker	Steinfurt, Deutschland
Parafilm	American National Can	Chicago, USA
Pasteurpipetten	NeoLab	Heidelberg, Deutschland
Petrischalen	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen	Biozym Scientific	Hess. Oldendorf, Deutschland
Pipettenspitzen	Rainin	Giessen, Deutschland
Reservoirs	VWR	Darmstadt, Deutschland
Röhrchen 50 ml	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Sterilfilter	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Urinbecher	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Zellschaber	SPL Life Science	Gyeongg, Korea

## 7.3. Antikörper

**Tab. 5: Auflistung der verwendeten Antikörper.**

Antikörper	Verdünnung	Spezies	Hersteller	Ort
β-Aktin	1:5000 (WB)	Maus, monoklonal	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
GPER	1:500 (IHC) 1:2000 (WB)	Kaninchen, polyklonal	Sigma Prestige	St. Louis, USA
GAPDH	1:5000 (WB)	Maus, monoklonal	Cell Biolabs Inc.	San Diego, USA
Mastzelltryptase	1:500 (IHC)	Maus, monoklonal	DAKO	Glostrup, Dänemark

## 7.5. Zweitantikörper

**Tab. 6: Auflistung der verwendeten Zweitantikörper.**

Antikörper	Verdünnung	Spezies	Hersteller	Ort
α-Kaninchen	1:500 (IHC)	Ziege, Biotin	Dianova	Hamburg, Deutschland
α-Kaninchen	1:30000 (WB)	Ziege, POX	Dianova	Hamburg, Deutschland
α-Maus	1:500 (IHC)	Ziege, Biotin	Dianova	Hamburg, Deutschland
α-Maus	1:5000 (WB)	Ziege, POX	Dianova	Hamburg, Deutschland

## 7.6. Stimulantien

**Tab. 7: Auflistung der verwendeten Stimulantien und ihrer Lösungsmittel.**

Stimulanz	Verdünnung	Hersteller	Ort
DMSO (1,1 g/mL)	0,01 ‰	Sigma Aldrich	St. Louis, USA
Ötradiol	1 nM - 1 µM	Sigma Aldrich	St. Louis, USA
Ethanol	1 nM - 1 µM	Sigma Aldrich	St. Louis, USA
G 1	10 nM - 3 µM	Tocris bioscience	Bristol, UK
G 15	1 µM	Tocris bioscience	Bristol, UK
Histamin	1 µM	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA

## 7.7. Kits

**Tab. 8: Auflistung der verwendeten Kits.**

Kit	Hersteller	Ort
CellTiter-Glo	Promega	Mannheim, Deutschland
DAB- Tablet Set	Sigma	Deisenhofen, Deutschland
DC Protein Assay Reagenz A, B, S	Biorad	München, Deutschland
Inhibitorcocktail	Thermo Scientific	Waltham, USA
Page Ruler	Biorad	München, Deutschland
Prolong Antifade Kit	Invitrogen	Karlsruhe, Deutschland
SuperSignal® West Femto	Thermo Scientific	Waltham, USA
SuperSignal® West Pico	Thermo Scientific	Waltham, USA
Vectashield Mounting Medium with DAPI	Vector Laboratories	Burlingame, USA
Vectastain ABC Kit	Vector Laboratories	Burlingame, USA

## 7.9. Reagenzien

**Tab. 9: Auflistung der verwendeten Reagenzien.**

Reagenz	Hersteller	Ort
β-Mercaptoethanol	Sigma	Deissenhofen, Deutschland
Acrylamid 2K – Lösung (30 %)	Applichem	Darmstadt, Deutschland
Ammoniumpersulfat (APS)	Biorad	München, Deutschland
Borsäure	Sigma	Deissenhofen, Deutschland
Bromphenolblau	Serva	Heidelberg, Deutschland
BSA	PAA	Cölbe, Deutschland
CasyClean	Innovatis	Reutlingen, Deutschland
CasyTon	Innovatis	Reutlingen, Deutschland
DMSO (1,1 g/mL)	Sigma	Deissenhofen, Deutschland
DMEM high Glucose	PAA	Cölbe, Deutschland
Entellan	Merck	Darmstadt, Deutschland
Ethanol 100 % p.a.	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Essigsäure	Sigma	Deissenhofen, Deutschland
FCS	PAA	Cölbe, Deutschland
Formaldehyd	Sigma	Deissenhofen, Deutschland
Glycerin	Merck	Darmstadt, Deutschland
Glycin	Applichem	Darmstadt, Deutschland
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 30 %	Sigma	Deissenhofen, Deutschland
Isopropanol	Klinikum Rechts der Isar	München, Deutschland
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Merck	Darmstadt, Deutschland
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck	Darmstadt, Deutschland
Methanol	Roth	Karlsruhe, Deutschland
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (Temed 100 %)	Biorad	München, Deutschland
Na-III-Citrat	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Merck	Darmstadt, Deutschland
NaCl	Merck	Darmstadt, Deutschland
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	Merck	Darmstadt, Deutschland
Normalserum goat	Sigma	Deissenhofen, Deutschland
Paraformaldehyd (PFA)	Merck	Darmstadt, Deutschland
PBS dulbecco (9,55 g/l)	Biochrom	Berlin, Deutschland
pH Kalibrierlösung pH 4, 7, 10	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Pipes disodium salt	Sigma	Deissenhofen, Deutschland
Ponceau S	Sigma	Deissenhofen, Deutschland
Saccharose	Merck	Darmstadt, Deutschland
Salzsäure	Roth	Karlsruhe, Deutschland
SDS	Sigma	Deissenhofen, Deutschland
Tris Base	Sigma	Deissenhofen, Deutschland
Triton X100	Biorad	München, Deutschland
Trypsin-EDTA	PAA	Cölbe, Deutschland
Tween 20	Sigma	Deissenhofen, Deutschland
Xylol mind. 99 %	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Zitronensäure	Roth	Karlsruhe, Deutschland

### 7.11. Puffer und Lösungen

**Tab. 10: Rezepturen zur Herstellung der verwendeten Puffer und Lösungen.**

<b>Puffer</b>	<b>Einzelkomponenten</b>
Bouinsche Lösung	15 ml gesättigte, wässrige Pikrinsäure 5 ml Formalinlösung (35 %) 1 ml Eisessig (kurz vor Gebrauch zusetzen)
NPE-Puffer für Proteinlysate	4,4 g NaCl (150 mM) 1,5 g Pipes (10 mM) 0,15 g EDTA (1 mM) Auffüllen auf 500 ml mit H <sub>2</sub> O bidest, pH 7.2
PBS Puffer (10 mM)	319,5 mg Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (4,5 mM) 171,2 mg KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (1,5 mM) 93,3 mg KCl (2,5 mM) 4,4 g NaCl (150 mM) Auffüllen auf 500 ml mit H <sub>2</sub> O bidest, pH 7.5
1 x Probenpuffer für Proteinlysate	1,89 g Tris (62,5 mM) 5 g SDS (2 %) 25 g Saccharose (10 %) Auffüllen auf 250 ml mit H <sub>2</sub> O bidest, pH 6,8
APS Für SDS-PAGE (10 %)	1 g APS lösen in 10 ml H <sub>2</sub> O bidest
Laemmlipuffer (10 x) für SDS-PAGE3	0,28 g Tris (250 mM) 144,12 g Glycin (1,92 M) 10 g SDS (1 %) auffüllen auf 1 l mit H <sub>2</sub> O bidest
Bromphenolblau	0,75 g Tris (62,5 mM) 10 g SDS (2 %) 10 g Saccharose (10 %) auffüllen auf 100 ml mit H <sub>2</sub> O bidest, pH 6,8
Sammelgelpuffer (4 x) für SDS-PAGE	15,2 g Tris (0,5 M) 0,75 g EDTA auffüllen auf 250 ml mit H <sub>2</sub> O bidest, pH 6,8 1 g SDS (10 %) zugeben
SDS für SDS-PAGE (10 %)	1 g SDS in 10 ml H <sub>2</sub> O bidest lösen
Trenngelpuffer (4x) für SDS-PAGE	45,4 g Tris (1,5 M) 0,75 g EDTA auffüllen auf 250 ml mit H <sub>2</sub> O bidest, pH 8,8 1 g SDS (10 %) zugeben
10 x Transferpuffer für Westernblot	144,1 g Glycin (1,92 M) 121,1 g Tris Base (250 mM) 100 ml Methanol (10 %) 1 ml SDS (0,01 %) auffüllen auf 1 l mit H <sub>2</sub> O bidest

10 x Ponceau S	1 g Ponceau S lösen in 500 ml 3 % ige Trichloressigsäure
20 x TBS-Tween	116,8 g NaCl (2 M) 12,1 g Tris Base 10 ml Tween 20 (1 %) auffüllen auf 1 l mit H <sub>2</sub> O bidest, pH 7,5
TBE-Puffer (5 x) für Agarose-Gelelektrophorese	54 g Tris 27,5 g Borsäure 20 ml EDTA (0,5 M) auffüllen auf 1 l mit H <sub>2</sub> O bidest, pH 8
Stammlösung A für IHC (0,1 M)	21,01 g Zitronensäure in 1 l H <sub>2</sub> O bidest lösen
Stammlösung B für IHC (0,1 M)	29,41 g Na-III-citrat in 1 l H <sub>2</sub> O bidest lösen
KPBS für Immunzytochemie (0,12 M)	1,47 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 8,59 g K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 27 g NaCl auffüllen auf 0,5 l mit H <sub>2</sub> O bidest, pH 7,4
LKPBS für Immunzytochemie	48,85 ml KPBS 1 ml Serum 0,15 ml Triton X100

## 7.12. Medien

**Tab. 11: Rezepturen zur Herstellung der verwendeten Medien.**

Medium	Einzelkomponenten
Erstmedium für Kultivierung von HTPCs	210 ml DMEM high Glucose 1,19 g HEPES (20 mM) 0,125 g NaHCO <sub>3</sub> (0,5 g/l) 37,5 ml FBS (15 %) 2,5 ml Penicillin/ Streptomycin (1 %)
DMEM high Glucose Kulturmedium für HTPCs	500 ml DMEM high Glucose 10 % FCS 2,5 ml Penicillin/ Streptomycin (1 %)
Einfriermedium für HTPCs	500 ml DMEM high Glucose 10 % DMSO

### 7.13. Programme und Software

**Tab. 12: Auflistung der verwendeten Programme und Software.**

<b>Programm</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Ort</b>
Illustrator	Adobe Systems, Inc.	San Jose, USA
ImageJ 1.42 q	National Institutes of Health	USA
iMovie	Apple	Cupertino, USA
Micro-Manager 1.3	Vale's Lab UCFS	San Francisco, USA
Leica Confocal Software v 2.6.1	Leica	Wetzlar, Deutschland
Photoshop CS 3	Adobe Systems, Inc.	San Jose, USA
Spot imaging software	SPOT Imaging Solutions	Burroughs, USA
Prism Graphpad 4.0	GraphPad Software, Inc.	La Jolla, USA

## 8. Literatur und Quellenverzeichnis

1. Welsch U, Deller T. Sobotta Lehrbuch Histologie: Unter Mitarbeit von Thomas Deller. Auflage: 3. München: Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH; 2010. 608 p.
2. Kerr JB. Functional cytology of the human testis. *Baillières Clin Endocrinol Metab.* 1992 Apr;6(2):235–50.
3. Murdoch FE, Goldberg E. Male contraception: Another holy grail. *Bioorg Med Chem Lett.* 2014 Jan;24(2):419–24.
4. Schünke M, Schulte E, Schumacher U. Prometheus LernAtlas der Anatomie. Stuttgart: Thieme; 2012.
5. Aumüller G. Anatomie. Stuttgart: Georg Thieme; 2010.
6. Welter H, Kampfer C, Lauf S, Feil R, Schwarzer JU, Köhn F-M, et al. Partial loss of contractile marker proteins in human testicular peritubular cells in infertility patients. *Andrology.* 2013 Mar;1(2):318–24.
7. Hargrove JL, MacIndoe JH, Ellis LC. Testicular contractile cells and sperm transport. *Fertil Steril.* 1977 Nov;28(11):1146–57.
8. Flenkenthaler F, Windschüttl S, Fröhlich T, Schwarzer JU, Mayerhofer A, Arnold GJ. Secretome Analysis of Testicular Peritubular Cells: A Window into the Human Testicular Microenvironment and the Spermatogonial Stem Cell Niche in Man. *J Proteome Res.* 2014 Mar 7;13(3):1259–69.
9. Mayerhofer A. Human testicular peritubular cells: more than meets the eye. *Reproduction.* 2013 May 1;145(5):R107–16.
10. Chimento A, Sirianni R, Casaburi I, Pezzi V. Role of Estrogen Receptors and G Protein-Coupled Estrogen Receptor in Regulation of Hypothalamus–Pituitary–Testis Axis and Spermatogenesis. *Front Endocrinol.* 2014;5.
11. Carreau S, Bouraima-Lelong H, Delalande C. Estrogen, a female hormone involved in spermatogenesis. *Adv Med Sci.* 2012 Jun 1;57(1):31–6.
12. Nieschlag E, Behre HM, Nieschlag S. Andrologie Grundlagen und Klinik der reproduktiven Gesundheit des Mannes. Heidelberg: Springer Medizin; 2009.
13. Clermont Y. Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiol Rev.* 1972 Jan;52(1):198–236.
14. De Kretser DM. Male infertility. *The Lancet.* 1997;349(9054):787–90.
15. Schell C, Albrecht M, Mayer C, Schwarzer JU, Frungieri MB, Mayerhofer A. Exploring Human Testicular Peritubular Cells: Identification of Secretory Products and Regulation by Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ . *Endocrinology.* 2008 Apr;149(4):1678–86.
16. Spinnler K, Köhn FM, Schwarzer U, Mayerhofer A. Glial cell line-derived neurotrophic factor is constitutively produced by human testicular peritubular cells and may contribute to the spermatogonial stem cell niche in man. *Hum Reprod Oxf Engl.* 2010 Sep;25(9):2181–7.
17. Davidoff MS, Breucker H, Holstein AF, Seidl K. Cellular architecture of the lamina propria of human seminiferous tubules. *Cell Tissue Res.* 1990 Nov;262(2):253–61.
18. Meineke V, Frungieri MB, Jessberger B, Vogt H, Mayerhofer A. Human testicular mast cells contain tryptase: increased mast cell number and altered distribution in the testes of infertile men. *Fertil Steril.* 2000 Aug;74(2):239–44.
19. Haider SG, Talati J, Servos G. Ultrastructure of peritubular tissue in association with tubular hyalinization in human testis. *Tissue Cell.* 1999 Feb;31(1):90–8.
20. Raithel M, Matek M, Baenkler HW, Jorde W, Hahn EG. Mucosal histamine content and histamine secretion in Crohn's disease, ulcerative colitis and allergic en-

- teropathy. *Int Arch Allergy Immunol*. 1995 Oct;108(2):127–33.
21. Albrecht M, Frungieri MB, Gonzalez-Calvar S, Meineke V, Köhn FM, Mayerhofer A. Evidence for a histaminergic system in the human testis. *Fertil Steril*. 2005 Apr;83(4):1060–3.
  22. Gülkesen KH, Erdoğan T, Sargin CF, Karpuzoğlu G. Expression of extracellular matrix proteins and vimentin in testes of azoospermic man: an immunohistochemical and morphometric study. *Asian J Androl*. 2002 Mar;4(1):55–60.
  23. Frungieri MB, Weidinger S, Meineke V, Köhn FM, Mayerhofer A. Proliferative action of mast-cell tryptase is mediated by PAR2, COX2, prostaglandins, and PPAR $\gamma$ : possible relevance to human fibrotic disorders. *Proc Natl Acad Sci*. 2002;99(23):15072–7.
  24. Hutson JC. Secretion of tumor necrosis factor alpha by testicular macrophages. *J Reprod Immunol*. 1993 Jan;23(1):63–72.
  25. Mauduit C, Besset V, Caussanel V, Benahmed M. Tumor necrosis factor alpha receptor p55 is under hormonal (follicle-stimulating hormone) control in testicular Sertoli cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996 Jul 25;224(3):631–7.
  26. Delfino FJ, Boustead JN, Fix C, Walker WH. NF-kappaB and TNF-alpha stimulate androgen receptor expression in Sertoli cells. *Mol Cell Endocrinol*. 2003 Mar 28;201(1-2):1–12.
  27. Suescun MO, Rival C, Theas MS, Calandra RS, Lustig L. Involvement of tumor necrosis factor-alpha in the pathogenesis of autoimmune orchitis in rats. *Biol Reprod*. 2003 Jun;68(6):2114–21.
  28. Oatley JM, Brinster RL. The Germline Stem Cell Niche Unit in Mammalian Testes. *Physiol Rev*. 2012 Apr 1;92(2):577–95.
  29. Nieschlag E. Infertilität bei Männern: Aktuelle Entwicklungen. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz*. 2013 Nov 23;56(12):1619–27.
  30. Abu-Halima M, Backes C, Leidinger P, Keller A, Lubbad AM, Hammadeh M, et al. MicroRNA expression profiles in human testicular tissues of infertile men with different histopathologic patterns. *Fertil Steril*. 2014 Jan;101(1):78–86.e2.
  31. Welter H, Köhn FM, Mayerhofer A. Mast cells in human testicular biopsies from patients with mixed atrophy: increased numbers, heterogeneity, and expression of cyclooxygenase 2 and prostaglandin D2 synthase. *Fertil Steril*. 2011 Aug;96(2):309–13.
  32. Frungieri MB, Calandra RS, Lustig L, Meineke V, Köhn FM, Vogt HJ, et al. Number, distribution pattern, and identification of macrophages in the testes of infertile men. *Fertil Steril*. 2002 Aug;78(2):298–306.
  33. Spiess A-N, Feig C, Schulze W, Chalmel F, Cappallo-Obermann H, Primig M, et al. Cross-platform gene expression signature of human spermatogenic failure reveals inflammatory-like response. *Hum Reprod Oxf Engl*. 2007 Nov;22(11):2936–46.
  34. Schell C, Albrecht M, Spillner S, Mayer C, Kunz L, Köhn FM, et al. 15-Deoxy- $\Delta^{12-14}$ -Prostaglandin-J2 Induces Hypertrophy and Loss of Contractility in Human Testicular Peritubular Cells: Implications for Human Male Fertility. *Endocrinology*. 2010 Mar;151(3):1257–68.
  35. Sigg C, Hedinger C. Quantitative and ultrastructural study of germinal epithelium in testicular biopsies with “mixed atrophy.” *Andrologia*. 1981 Oct;13(5):412–24.
  36. Stahl PJ, Mielnik AN, Barbieri CE, Schlegel PN, Paduch DA. Deletion or under-expression of the Y-chromosome genes CDY2 and HSFY is associated with maturation arrest in American men with nonobstructive azoospermia. *Asian J Androl*.



- 2012;14(5):676–82.
37. Banek L, Hittmair A, Pezerović-Panijan R, Goluvza T, Schulze W. Mast cells in testicular biopsies of infertile men with “mixed atrophy” of seminiferous tubules. *Andrologia*. 1999;31(4):203–10.
  38. Alhalabi M, Kenj M, Monem F, Mahayri Z, Abou Alchamat G, Madania A. High prevalence of genetic abnormalities in Middle Eastern patients with idiopathic non-obstructive azoospermia. *J Assist Reprod Genet*. 2013 Apr 25;30(6):799–805.
  39. Luboshitzky R, Kaplan-Zverling M, Shen-Orr Z, Nave R, Herer P. Seminal plasma androgen/oestrogen balance in infertile men. *Int J Androl*. 2002;25(6):345–51.
  40. Lucas TFG, Pimenta MT, Pisolato R, Lazari MFM, Porto CS. 17 $\beta$ -estradiol signaling and regulation of Sertoli cell function. *Spermatogenesis*. 2011 Oct 1;1(4):318–24.
  41. Rochira V, Granata ARM, Madeo B, Zirilli L, Rossi G, Carani C. Estrogens in males: what have we learned in the last 10 years? *Asian J Androl*. 2005 Mar;7(1):3–20.
  42. Hess RA, Fernandes SAF, Gomes GRO, Oliveira CA, Lazari MFM, Porto CS. Estrogen and Its Receptors in Efferent Ductules and Epididymis. *J Androl*. 2011 Mar 25;32(6):600–13.
  43. Dennis MK, Field AS, Burai R, Ramesh C, Petrie WK, Bologna CG, et al. Identification of a GPER/GPR30 antagonist with improved estrogen receptor counterselectivity. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2011 Nov;127(3-5):358–66.
  44. Carreau S, Bouraima-Lelong H, Delalande C. Estrogens in male germ cells. *Spermatogenesis*. 2011 Apr 1;1(2):90–4.
  45. Carreau S, Bouraima-Lelong H, Delalande C. Estrogen, a female hormone involved in spermatogenesis. *Adv Med Sci*. 2012 Jan 1;57(1).
  46. Carreau S, Hess RA. Oestrogens and spermatogenesis. *Philos Trans R Soc B Biol Sci*. 2010 Apr 19;365(1546):1517–35.
  47. Filardo EJ, Thomas P. Minireview: G Protein-Coupled Estrogen Receptor-1, GPER-1: Its Mechanism of Action and Role in Female Reproductive Cancer, Renal and Vascular Physiology. *Endocrinology*. 2012 Jul;153(7):2953–62.
  48. Prossnitz ER, Barton M. The G-protein-coupled estrogen receptor GPER in health and disease. *Nat Rev Endocrinol*. 2011 Dec;7(12):715–26.
  49. Filipiak E, Suliborska D, Laszczynska M, Walczak-Jedrzejowska R, Oszukowska E, Marchlewska K, et al. Estrogen receptor alpha localization in the testes of men with normal spermatogenesis. *Folia Histochem Cytobiol*. 2012 Oct 8;50(3):340–5.
  50. Akingbemi BT. Estrogen regulation of testicular function. *Reprod Biol Endocrinol RBE*. 2005;3:51.
  51. Barton M. Position paper: The membrane estrogen receptor GPER – Clues and questions. *Steroids*. 2012 Aug;77(10):935–42.
  52. Hall JM. The Multifaceted Mechanisms of Estradiol and Estrogen Receptor Signaling. *J Biol Chem*. 2001 Jul 17;276(40):36869–72.
  53. Lucas TFG, Royer C, Siu ER, Lazari MFM, Porto CS. Expression and Signaling of G Protein-Coupled Estrogen Receptor 1 (GPER) in Rat Sertoli Cells. *Biol Reprod*. 2010 May 5;83(2):307–17.
  54. Revankar CM, Cimino DF, Sklar LA, Arterburn JB, Prossnitz ER. A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science*. 2005 Mar 11;307(5715):1625–30.
  55. Prossnitz ER, Barton M. Estrogen biology: New insights into GPER function and clinical opportunities. *Mol Cell Endocrinol*. 2014 Feb 12;
  56. Prossnitz ER, Arterburn JB, Smith HO, Oprea TI, Sklar LA, Hathaway HJ. Estrogen Signaling through the Transmembrane G Protein-Coupled Receptor GPR30. *Annu*

- Rev Physiol. 2008 Mar;70(1):165–90.
57. Meyer MR, Haas E, Prossnitz ER, Barton M. Non-genomic regulation of vascular cell function and growth by estrogen. *Mol Cell Endocrinol*. 2009 Sep;308(1-2):9–16.
  58. Karlson P. *Karlsons Biochemie und Pathobiochemie*. Auflage: 15., vollst. überarb. u. neugestalt. Aufl. Stuttgart u.a.: Thieme; 2005. 803 p.
  59. Thomas P, Pang Y, Filardo EJ, Dong J. Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells. *Endocrinology*. 2005 Feb;146(2):624–32.
  60. Filardo EJ, Quinn JA, Frackelton AR Jr, Bland KI. Estrogen action via the G protein-coupled receptor, GPR30: stimulation of adenylyl cyclase and cAMP-mediated attenuation of the epidermal growth factor receptor-to-MAPK signaling axis. *Mol Endocrinol Baltim Md*. 2002 Jan;16(1):70–84.
  61. Filardo EJ, Quinn JA, Bland KI, Frackelton AR Jr. Estrogen-induced activation of Erk-1 and Erk-2 requires the G protein-coupled receptor homolog, GPR30, and occurs via trans-activation of the epidermal growth factor receptor through release of HB-EGF. *Mol Endocrinol Baltim Md*. 2000 Oct;14(10):1649–60.
  62. Roskoski R. ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation. *Pharmacol Res Off J Ital Pharmacol Soc*. 2012 Aug;66(2):105–43.
  63. Chakrabarti S, Davidge ST. G-Protein Coupled Receptor 30 (GPR30): A Novel Regulator of Endothelial Inflammation. Wallace J, editor. *PLoS ONE*. 2012 Dec 20;7(12):e52357.
  64. Levin ER. G Protein-Coupled Receptor 30: Estrogen Receptor or Collaborator? *Endocrinology*. 2009 Apr;150(4):1563–5.
  65. Maggiolini M, Picard D. The unfolding stories of GPR30, a new membrane-bound estrogen receptor. *J Endocrinol*. 2010 Feb;204(2):105–14.
  66. Chevalier N, Vega A, Bouskine A, Siddeek B, Michiels J-F, Chevallier D, et al. GPR30, the Non-Classical Membrane G Protein Related Estrogen Receptor, Is Overexpressed in Human Seminoma and Promotes Seminoma Cell Proliferation. Migliaccio A, editor. *PLoS ONE*. 2012 Apr 4;7(4):e34672.
  67. Ariazi EA, Brailoiu E, Yerrum S, Shupp HA, Slifker MJ, Cunliffe HE, et al. The G protein-coupled receptor GPR30 inhibits proliferation of estrogen receptor-positive breast cancer cells. *Cancer Res*. 2010 Feb 1;70(3):1184–94.
  68. Chimento A, Casaburi I, Bartucci M, Patrizii M, Dattilo R, Avena P, et al. Selective GPER activation decreases proliferation and activates apoptosis in tumor Leydig cells. *Cell Death Dis*. 2013 Aug;4(8):e747.
  69. Rago V, Romeo F, Giordano F, Maggiolini M, Carpino A. Identification of the estrogen receptor GPER in neoplastic and non-neoplastic human testes. *Reprod Biol Endocrinol*. 2011;9(135.10):1186.
  70. Fietz D, Ratzenböck C, Hartmann K, Raabe O, Kliesch S, Weidner W, et al. Expression pattern of estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$  and G-protein-coupled estrogen receptor 1 in the human testis. *Histochem Cell Biol*. 2014 Apr 2;
  71. Bologna CG, Revankar CM, Young SM, Edwards BS, Arterburn JB, Kiselyov AS, et al. Virtual and biomolecular screening converge on a selective agonist for GPR30. *Nat Chem Biol*. 2006 Mar 5;2(4):207–12.
  72. Dennis MK, Burai R, Ramesh C, Petrie WK, Alcon SN, Nayak TK, et al. In vivo effects of a GPR30 antagonist. *Nat Chem Biol*. 2009 May 3;5(6):421–7.
  73. Schlatt S, Weinbauer GF, Arslan M, Nieschlag E. Appearance of  $\alpha$ -Smooth Muscle Actin in Peritubular Cells of Monkey Testes Is Induced by Androgens, Modulated by Follicle-Stimulating Hormone, and Maintained after Hormonal Withdrawal. *J*

- Androl. 1993;14(5):340–50.
74. Mayerhofer A, Kunz L, Krieger A, Proskocil B, Spindel E, Amsterdam A, et al. FSH regulates acetylcholine production by ovarian granulosa cells. *Reprod Biol Endocrinol RBE*. 2006;4:37.
  75. Adam M, Schwarzer JU, Kohn FM, Strauss L, Poutanen M, Mayerhofer A. Mast cell tryptase stimulates production of decorin by human testicular peritubular cells: possible role of decorin in male infertility by interfering with growth factor signaling. *Hum Reprod*. 2011 Jul 25;26(10):2613–25.
  76. Adam M, Urbanski HF, Garyfallou VT, Welsch U, Köhn FM, Ullrich Schwarzer J, et al. High levels of the extracellular matrix proteoglycan decorin are associated with inhibition of testicular function: Decorin and testicular function. *Int J Androl*. 2012 Aug;35(4):550–61.
  77. Albrecht M, Rämisch R, Köhn FM, Schwarzer JU, Mayerhofer A. Isolation and Cultivation of Human Testicular Peritubular Cells: A New Model for the Investigation of Fibrotic Processes in the Human Testis and Male Infertility. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006 May;91(5):1956–60.
  78. Ji TH, Grossmann M, Ji I. G Protein-coupled Receptors I. Diversity of receptor-ligand interactions. *J Biol Chem*. 1998 Jul 10;273(28):17299–302.
  79. Ho KJ, Liao JK. Non-nuclear actions of estrogen: new targets for prevention and treatment of cardiovascular disease. *Mol Interv*. 2002 Jul;2(4):219–28.
  80. Kelly MJ, Levin ER. Rapid actions of plasma membrane estrogen receptors. *Trends Endocrinol Metab TEM*. 2001 Jun;12(4):152–6.
  81. Kim EK, Choi E-J. Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Basis Dis*. 2010 Apr;1802(4):396–405.
  82. So EC, Lin Y-X, Tseng CH, Pan B-S, Cheng K-S, Wong K-L, et al. Midazolam induces apoptosis in MA-10 mouse Leydig tumor cells through caspase activation and the involvement of MAPK signaling pathway. *OncoTargets Ther*. 2014;7:211–21.
  83. Ignatov T, Modl S, Thulig M, Weißenborn C, Treeck O, Ortmann O, et al. GPER-1 acts as a tumor suppressor in ovarian cancer. *J Ovarian Res*. 2013;6(1):51.
  84. Li F, Yu X, Szykarski CK, Meng C, Zhou B, Barhoumi R, et al. Activation of GPER Induces Differentiation and Inhibition of Coronary Artery Smooth Muscle Cell Proliferation. *PloS One*. 2013;8(6):e64771.
  85. Carreau S, Bois C, Zanatta L, Silva FRMB, Bouraima-Lelong H, Delalande C. Estrogen signaling in testicular cells. *Life Sci*. 2011 Oct 10;89(15-16):584–7.
  86. Davis KE, Carstens EJ, Irani BG, Gent LM, Hahner LM, Clegg DJ. Sexually Dimorphic Role of G Protein-Coupled Estrogen Receptor (GPER) in Modulating Energy Homeostasis. *Horm Behav*. 2014 Feb 18;

## 9. Danksagung

Ganz herzlich möchte ich mich bei Herrn Prof. Mayerhofer für die Themenauswahl und die gute Anleitung und Betreuung bedanken. Dr. Harald Welter hat insbesondere zur Publikation der gewonnenen Erkenntnisse einen großen Teil beigetragen. Weiterhin gilt mein Dank allen Mitarbeitern des Lehrstuhls III- Anatomie und Zellbiologie der LMU München für die große Hilfsbereitschaft. Namentlich nennen möchte ich meine Kolleginnen Tine Mayer, Kerstin Schubert und Stefanie Windschüttl, die stets ein offenes Ohr hatten und mir auch außerhalb des Labors ans Herz gewachsen sind.

Für die finanzielle Förderung dieser Arbeit möchte ich mich bei der Friedrich-Baur-Stiftung bedanken.

Der größte Dank gilt meiner Familie und meinem Freund Klaus für die grenzenlose Unterstützung.

## **10. Publikation, Poster und Fördermittel**

### **Erstautorenschaft**

Sandner F, Welter H, Schwarzer JU, Köhn FM, Urbanski HF, Mayerhofer A.

Expression of the oestrogen receptor GPER by testicular peritubular cells is linked to sexual maturation and male fertility.

Andrology. 2014 Jul 23.

### **Poster, 5. DVR Kongress**

Sandner F, Welter H, Schwarzer JU, Köhn FM, Urbanski HF, Mayerhofer A.

Distribution of the estrogen receptor GPER in the testis: Expression by testicular peritubular cells and changes associated with testicular function.

5. DVR Kongress. Dachverband Reproduktionsbiologie und -medizin e.V., Münster, Dezember 2013.

### **Erfolgreicher Antrag auf Fördermittel**

Franziska Sandner.

Der G Protein-gekoppelte Östrogenrezeptor (GPER) im Hoden.

Verbrauchsmaterial im Wert von 8,861 € genehmigt im Juni 2013 von der Friedrich-Baur-Stiftung.